

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



Mgr. Michal Čáp

Diferenciace kolonií *Saccharomyces cerevisiae*

Differentiation in *Saccharomyces cerevisiae* colonies

Disertační práce

Školitelka: prof. Zdena Palková, CSc.

Praha, 2012

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně a veškeré použité literární zdroje jsou řádně citovány. Tato práce ani její podstatná část nebyla použita pro získání stejného nebo obdobného akademického titulu

V Praze, dne 24.4.2012

Michal Čáp

Poděkování:

Chtěl bych na tomto místě poděkovat své školitelce prof. Zdeně Palkové, CSc za laskavé vedení po dobu mého doktorského studia. Dále pak RNDr. Líba Váchové za konzultace a pomoc s tvorbou publikací. Celému kolektivu laboratoře S15 za příjemné pracovní prostředí a konečně svojí rodině za podporu po celou dlouhou dobu studia.

Abstrakt

Kvasinkové kolonie jsou, podobně jako bakteriální biofilmy, mnohobuněčnou strukturou tvořenou jednobuněčnými organismy. Tato společenstva mají svá specifika a v mnoha ohledech se liší od planktonních populací. Dochází zde k vytváření gradientů živin a metabolitů, což poskytuje základ pro buněčnou diferenciaci na rozdílné subpopulace. Přehled současných znalostí na toto téma s důrazem na kvasinkové biofilmy a kolonie je učiněn v Literárním úvodu této práce. Ve výsledkové části se pak věnuji diferenciaci kolonií kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, jako modelové mnohobuněčné mikrobiální struktury. Zabývám se zde hlubší charakterizací dříve popsané horizontální diferenciaci, tj. diferenciaci mezi středem a okrajem kolonie, a její vztah k amoniakové signalizaci a stresové rezistenci. Zaměřil jsem se na studium významu genů stresové rezistence, jako předpokládaného významného faktoru pro přežití kolonií, pro vývoj a diferenciaci kolonií. Výsledky poněkud překvapivě ukazují na to, že stresová rezistence sama o sobě není zásadní pro přežití a diferenciaci kolonie, pro tu jsou spíše důležité změny vyvolané amoniakovou signalizací. Druhým typem diferenciaci v kolonii je vertikální diferenciaci na horní a dolní vrstvu popsaná v této práci. Buňky v horní a spodní vrstvě kolonie se výrazně liší morfologií, stresovou rezistencí, expresním profilem a metabolickými charakteristikami. Buňky horní vrstvy jsou větší, odolnější vůči stresovým faktorům, akumulují zásobní látky a vykazují charakteristické metabolické změny připomínající metabolismus nádorových buněk. Naproti tomu buňky spodní vrstvy jsou menší, hůře přežívají, aktivují degradační procesy a respirativní metabolismus. Bylo navrženo, že tyto buňky slouží jako zdroj živin pro buňky horní vrstvy. Diferenciaci je zřejmě regulována signálními drahami TOR, GCN4 a SNF reagujícími na množství živin v okolí.

Abstract

Yeast colonies are, alongside to bacterial biofilms, multicellular communities formed by unicellular microorganisms. These specific communities differ in many ways from populations cultivated in planktonic cultivations. Gradients of nutrients, metabolic by-products and other factors are formed and preserved within these structures, which provides a basis for cellular differentiation. Current literature concerning these issues with emphasis on yeast colonies and biofilms is summarised in the Introduction of this work. Section Results then describes my contribution to the knowledge on the differentiation of the colonies of *Saccharomyces cerevisiae* as a model system for studying microbial multicellular structures. Previously described horizontal differentiation, i.e. differentiation between colony centre and margin, is further characterised with respect to ammonia signalling and stress resistance. The importance of genes conferring the cell's oxidative stress resistance in colony differentiation was studied and it was concluded that not stress resistance but rather metabolic and other changes promoted by ammonia signal are important for colony differentiation and survival. A new type of colony differentiation – the horizontal, i.e. differentiation between upper and lower part of the colony, is described in this work. Cells within the upper and lower region of differentiated colony differ markedly in their expression profile, physiology, metabolism, stress resistance and other factors. Cells of the upper layer are larger, highly stress-resistant, they accumulate energy reserves and activate specific metabolic pathways resembling tumour metabolism. On the other hand, cells of the lower layer are smaller, bear signs of stress and starvation, activate degradative processes and, surprisingly, also respirative metabolism. It was proposed that these cells provide nutrients for the upper cells to grow and survive. The differentiation is presumably regulated by the GCN, TOR and SNF pathways.

1 Úvod

Laboratoř Biologie kvasinkových kolonií se pod vedením prof. Zdeny Palkové, CSc. zabývá již téměř 15 let studiem fyziologie a morfologie kvasinkových kolonií jakožto modelového mikrobiálního společenství. Většina studií probíhá na druhu *Saccharomyces cerevisiae*, který je jedním z hlavních modelových organismů molekulární biologie. Vedle studia morfologie a fyziologie kolonií kmenů *S. cerevisiae* izolovaných z přírodních stanovišť (tzv. divokých kmenů), se v této laboratoři studují i mechanismy vývoje kolonií laboratorního kmene *S. cerevisiae* BY4742. Na těchto koloniích byla popsána amoniaková signalizace a alkalizace média (tzv. alkalická fáze růstu) a byl postupně objevován její význam pro vývoj kolonií. I když důvody i mechanismy vzniku amoniaku stejně jako mechanismy jeho účinku jsou málo objasněné, ukazuje se, že zřejmě mají významné dopady na fyziologii kolonií.

2 Cíle práce

Cílem této disertační práce je prohloubit znalosti o diferenciaci probíhající v kvasinkových koloniích, a to zejména:

- Objasnit úlohu genů stresové obrany v procesu vývoje kolonie. Geny protistresové obrany (alespoň některé) jsou nepostradatelné pro přežití kvasinkové populace v podmínkách třepaných tekutých kultur, ale jejich úloha v koloniích není objasněna, stejně jako jejich role v amoniakové signalizaci, jakožto důležitém faktoru regulujícím vývoj kolonií.
- Potvrdit nebo vyvrátit hypotézu získanou studiem delečního kmene *sok2Δ*, že produkce plynného amoniaku a vstup do alkalické fáze růstu je v koloniích induktorem diferenciaci (VACHOVA a PALKOVA, 2005).
- Získat další poznatky o diferenciaci kvasinkových kolonií.
- V literárním přehledu shrnout dostupnou literaturu týkající se diferenciaci, rozrůžňování a vzniku subpopulací u mnohobuněčných mikrobiálních společenstev.

3 Literární úvod

Donedávna se studium mikroorganismů zaměřovalo pouze na jejich chování v tekutých třepaných kulturách. Při tomto způsobu kultivace dochází k promíchávání kultivačního média a tím k homogenizaci živin, odpadních látek metabolismu a plynů. Buňky ztrácejí „poziční informaci“ a kontakt s okolními buňkami. Všechny buňky tak mají pro svůj růst stejné podmínky a výsledkem je homogenní populace. Naproti tomu v přirozených podmínkách, ať už při planktonním růstu ve vodním prostředí, nebo při růstu na pevném podkladu, dochází k formování gradientů živin a dalších látek.

Mikroorganismy v přirozeném prostředí velmi často tvoří mnohobuněčné struktury – biofilmy, kolonie, plodnice, povlaky, agregáty a vícedruhová konsorcia. V rámci těchto mnohobuněčných společenstev se vytvářejí nejrozumnější gradienty, buňky spolu navzájem komunikují prostřednictvím signálních molekul, případně kontaktu buňka-buňka a zachovávají si poziční informaci. Výsledkem kombinace těchto procesů je vytvoření celé škály rozdílných mikroprostředí v různých místech mnohobuněčné struktury, což vede k rozrůznění buněk v rámci této struktury a k její diferenciaci. Výzkum fyziologie, ekologie ale i molekulární biologie mikroorganismů se proto stále více zaměřuje na mnohobuněčná společenstva mikroorganismů a koncept „mnohobuněčných mikroorganismů“ se stává běžně přijímaným pohledem na bakterie. V následujících kapitolách se pokusím shrnout poznatky získané o nejrozumnějších mnohobuněčných mikrobiálních společenstvech s důrazem na diferenciaci buněk v rámci těchto společenstev a na signály, které ovlivňují jejich utváření. V další části se zaměřím na možné mechanismy diferenciaci a vzniku heterogenity v původně homogenní populaci buněk.

3.1 Biofilmy

Biofilm je podle širší definice agregát buněk, které jsou spojeny k sobě navzájem a celý útvar je přichycen k pevnému podkladu biotickému nebo abiotickému (KARATAN a WATNICK, 2009). Může se jednat o jedinou homogenní vrstvu buněk, stejně jako o komplexní strukturu tvořenou množstvím diferencovaných subpopulací a procházející dynamickým vývojem v čase a v závislosti na okolním prostředí. Biofilmy se vytvářejí

všude tam, kde nacházíme rozhraní pevného povrchu s vodním prostředím nebo vzduchem, ale i na rozhraní voda-vzduch. Je pravděpodobné, že naprostá většina mikroorganismů v přírodě žije ve formě biofilmu. V současné době je schopnost tvorby biofilmu vnímána jako univerzální vlastnost bakterií, jež je vlastní většině druhů a je vnímána jako alternativa k planktonnímu životu.

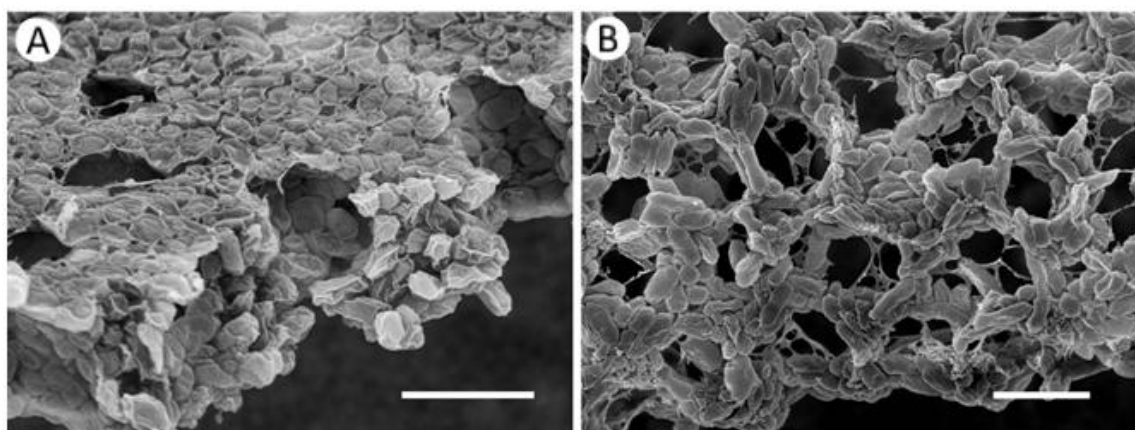
Život v biofilmu nese mnohé výhody: biofilmy jsou resistantnější k nejrůznějším toxickým látkám (klinicky významná je resistance biofilmů k antibiotikům), poskytují buňkám ochranu před vyschnutím, umožňují přežití v nepříznivých podmínkách a podobně. Modelové biofilmy jsou studovány v různých experimentálních uspořádáních: biofilm rostoucí na stěnách kapiláry, kterou proudí živné médium, biofilm rostoucí na stěnách jamek mikrotitrační destičky, koloniální biofilm rostoucí na pevném živném médiu, nebo v „drip-flow“ uspořádání, kde biofilm roste na kovové destičce omývané živným médiem za přístupu kyslíku (BARRAUD, *et al.*, 2006).

Ve většině případů je součástí biofilmu extracelulární matrix, která drží buňky biofilmu pohromadě a má také ochrannou funkci (obr.1) (LOPEZ, *et al.*, 2010). Složení matrix je druhově specifické a významně se liší i u stejného druhu v závislosti na podmínkách růstu. Matrix je tvořena především polysacharidovou složkou, ale významnou úlohu zde hrají i adhezivní proteiny a, alespoň u některých druhů, aktivně produkovaná extracelulární DNA (eDNA). Buňky biofilmu mají rozdílné fyziologické vlastnosti v porovnání s buňkami stejného druhu žijícími planktonní formě. U *Pseudomonas aeruginosa* bylo analýzou proteomu zjištěno, že u planktonní a biofilmové formy se liší exprese až poloviny genů (PATRAUCHAN, *et al.*, 2007). Transkriptomové analýzy *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* a *Staphylococcus aureus* naproti tomu prokázaly, že asi 10% genů je rozdílně exprimovaných mezi buňkami planktonní formy a biofilmu (HANCOCK a KLEMM, 2007; MOORTHY a WATNICK, 2004; RESCH, *et al.*, 2005; SCHEMBRI, *et al.*, 2003).

Hlavními modelovými organismy pro studium biofilmů jsou Gram-negativní bakterie *Escherichia coli*, jako hlavní model bakteriální molekulární biologie a biochemie, oportunistický patogen *Pseudomonas aeruginosa* a patogen *Vibrio cholerae*, původce cholery, a dále pak z Gram-pozitivních bakterií *Bacillus subtilis*, nejvíce studovaná Gram-pozitivní bakterie, a významný patogen *Staphylococcus aureus*.

3.1.1 Vývoj biofilmu

Biofilm představuje dynamickou strukturu, která se s časem mění a prodělává „životní cyklus“. Prvním krokem je prvotní přichycení jedné nebo více buněk nebo buněčných shluků k podkladu pomocí adhezivních proteinů a jejich růst až do vytvoření biofilmu. Biofilm roste a postupně maturuje. Konečnou fází vývoje biofilmu je rozptýlení, kdy se z horních vrstev biofilmu uvolňují buňky nebo agregáty buněk, které pak dají podle podmínek základ buď planktoně žijící populaci, nebo, po přichycení k podkladu, dalšímu biofilmu.



Obr. 1 - Bakteriální biofilm. A), B) buňky *Haemophilus influenzae* v biofilmu snímáné elektronovým rastrovacím mikroskopem. Dobře patrné jsou nejrůznější kanálky v biofilmu (GALLAHER, *et al.*, 2006).

3.1.1.1 Signály regulující vývoj biofilmu

Každá z popsaných fází vývoje biofilmu může být regulována. Prvotní přichycení k podkladu zajišťují předem nasyntetizované adhezivní proteiny – adhesiny (KARATAN a WATNICK, 2009). Přichycení k podložce pomocí adhesinů je u mnoha druhů pouze přechodné. K trvalému přichycení je třeba ještě nasyntetizování dalších proteinů. Například u *Pseudomonas fluorescens* je přechod k trvalému přichycení zprostředkován adhesinem kódovaným genem *lapA*, který je napojen na signalizační dráhu řízenou druhým poslem cyklickým diguanylát monofosfátem (c-di-GMP) (HINSA, *et al.*, 2003). Dalším signálem pro tvorbu permanentního přichycení je mechanický signál pevné podložky, o kterém se spekuluje, že by mohl být vnímán skrz odpor kladený proti otáčení bičíku (KLAUSEN, *et al.*, 2003b).

Živiny a kultivační podmínky

Zásadním signálem regulujícím tvorbu biofilmu u všech studovaných druhů je přítomnost živin v okolním prostředí. U některých druhů jako *Salmonella typhimurium* dochází k tvorbě biofilmu v prostředí limitace živin a je aktivována alternativním sigma faktorem RpoS specifickým pro stacionární fázi (GERSTEL a ROMLING, 2003). Naopak u *V. cholerae* ten samý RpoS inhibuje tvorbu biofilmu (YILDIZ, *et al.*, 2004). Podobnou roli hraje i glukosová katabolická represe. U druhů jako *E. coli*, *P. aureginosa* nebo *B. subtilis* je tvorba biofilmu blokována katabolickou represí za přítomnosti glukosy (nebo, v případě *P. aureginosa*, intermediátů Krebsova cyklu jako preferovaného substrátu) (JACKSON, *et al.*, 2002; O'TOOLE, *et al.*, 2000; STANLEY, *et al.*, 2003). U jiných druhů (*Streptococcus mutans*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* nebo *V. cholerae*) naproti tomu přítomnost glukosy a aktivace katabolické represe zvyšuje schopnost vytvářet biofilm (DOBINSKY, *et al.*, 2003; LIM, *et al.*, 2004; SHEMESH, *et al.*, 2007; YILDIZ, *et al.*, 2004). Podobně jako glukosa také železo je v některých případech induktorem a v některých inhibitem tvorby biofilmu. Příkladem první zmíněné možnosti jsou *P. aureginosa* a *V. cholerae*, inhibice tvorby biofilmu železem byla popsána např. u *S. epidermidis* (BANIN, *et al.*, 2005; DEIGHTON a BORLAND, 1993; MEY, *et al.*, 2005).

Regulován je i vývoj a vlastnosti biofilmu v závislosti na podmínkách kultivace. Například *V. cholerae* je schopno v médiu s glukosou tvořit mnohovrstevný biofilm, který vzniká z buněk schopných přichycení jak k pevnému podkladu, tak k sobě navzájem. Naproti tomu při kultivaci v médiu bez glukosy se vytváří jednovrstevný biofilm, kde jsou buňky přichyceny pouze k podkladu a nikoli vzájemně k sobě a vytvoří se tím povlak podkladu o tloušťce jedné buňky (MOORTHY a WATNICK, 2004). Buňky obou typů biofilmu se liší zastoupením povrchových adhesinů a dalšími vlastnostmi jako je pohyblivost a některé metabolické charakteristiky. Navíc morfologie mnohovrstevného biofilmu u této bakterie je také regulována v závislosti na okolních podmínkách. Ve sladké vodě se tvoří nepravidelný biofilm s množstvím výstupků, zatímco v mořské vodě je biofilm hladší a pokrývá větší plochu (KIEREK a WATNICK, 2003).

Podobně *P. aureginosa* při kultivaci v průtokové komůrce tvoří různé morfotypy biofilmů v závislosti na zdroji uhlíku v médiu (KLAUSEN, *et al.*, 2003b). Za přítomnosti sukcinátu nebo citrátu, preferovaného zdroje uhlíku u tohoto organismu, dochází

k tvorbě hladkého a nízkého biofilmu, který rovnoměrně pokrývá podklad. Naproti tomu při kultivaci na glukose jako zdroji uhlíku je biofilm tlustší a nepravidelný, nepokrývá celý podklad rovnoměrně a v mnoha místech se tvoří útvary podobné plodnicím. V tomto případě se ukázala klíčová pohyblivost buněk, ať už flagelární, nebo ta zprostředkovaná pilusy typu IV („twitching motility“) (KLAUSEN, *et al.*, 2003a). V obou případech dochází při delecí genů nutných pro daný typ pohybu k narušení morfologie biofilmu. Pomocí pozorování kmenů označených fluorescenčními proteiny v čase byl objasněn mechanismus vzniku obou typů biofilmů. Populace buněk, která dá základ biofilmu, se skládá ze dvou subpopulací nepohyblivých a pohyblivých buněk. Při kontaktu s podkladem se nepohyblivé buňky začínají dělit a dávají vzniknout mikrokoloniím. Nepohyblivé buňky se v této fázi nedělí. První fáze tvorby biofilmu – přichycení na podložku a tvorba mikrokolonií s nepohyblivými buňkami - probíhá stejně na obou typech média (glukosa i citrát). Na citrátovém médiu ale dochází v mikrokoloniích poměrně záhy k výskytu vysoce pohyblivých buněk, které migrují z mikrokolonie do okolí a rovnoměrně pokryjí celý podklad. K tomuto pohybu jsou nezbytné pily čtvrtého typu. Na glukosovém médiu takové pohyblivé buňky nevznikají, ale mikrokolonie jsou naopak obsazeny buňkami ze subpopulace pohyblivých buněk z okolí mikrokolonie a tyto buňky kolonizují mikrokolonie na kterých vytvoří plodnicovitý útvar. Tento proces závisí na obou typech pohybu – závislém na flagele i pilech (PARSEK a TOLKER-NIELSEN, 2008). Podobným mechanismem, tedy ovlivněním schopnosti buněk se pohybovat, ovlivňují morfologii biofilmu i další živiny v okolí jako železo nebo fosfát a i jiné environmentální signály (např. quorum sensing).

Quorum sensing

Tvorba biofilmů je také regulována signalizačními molekulami zajišťujícími quorum sensing. Quorum sensing je nejlépe prostudovaným typem mezibuněčné signalizace u bakterií. Jde o společnou odpověď celé bakteriální populace na přítomnost signalizační molekuly zvané autoinduktor. Autoinduktor se produkuje ve všech buňkách populace a jeho koncentrace tudíž závisí na buněčné hustotě. Pokud dojde k překročení určité prahové hranice koncentrace autoinduktoru, spustí se signální dráha regulující genovou expresi. Tento druh signalizace umožňuje bakteriální populaci synchronizovaně měnit svou genovou expresi v závislosti na hustotě kultury.

Jako první byla popsána takováto regulace u luminiscenční mořské bakterie *Vibrio*

fischeri, kde je signální dráha spouštějící produkci proteinů zajišťujících luminiscenci regulována transkripčním aktivátorem LuxR, který reaguje na hladinu *N*-3-oxo-hexanoyl homoserin laktonu (SITNIKOV, *et al.*, 1995). Ten je produkován všemi buňkami kultury enzymem LuxI. LuxR slouží jako receptor a efektor najednou. Od té doby byl podobný LuxR/LuxI systém popsán u řady Gram-negativních bakterií (JAYARAMAN a WOOD, 2008). Jako autoinduktor jsou používány různě acylované homoserin laktony (AHL). Daný AHL je většinou druhově specifický a jiné druhy neregistrují AHL určitého bakteriálního druhu.

Jiným druhem quorum sensing je signalizace pomocí autoinduktoru 2 (AI-2) (JAYARAMAN a WOOD, 2008). Jedná se o furanosyl borátový ester, který produkuje řada Gram-pozitivních i Gram-negativních bakteriálních druhů. Jeho funkce byla poprvé popsána u *Vibrio harveyi*, kde je produkován enzymem LuxS. Homology tohoto enzymu jsou v celé řadě bakteriálních druhů. Velice zajímavý je fakt, že na přítomnost AI-2 jsou schopny reagovat i druhy, které ho samy nedokáží produkovat. AI-2 je tedy příkladem signální molekuly, která slouží i jako mezidruhový signál.

U Gram-pozitivních bakterií se vyskytuje ještě další druh quorum sensing, který je zprostředkováván krátkými peptidy (JAYARAMAN a WOOD, 2008). Jeho detekce je zajišťována dvojkomponentovou signální dráhou, kde membránový receptor s kinasovou aktivitou váže extracelulární peptid a signál je dále přenesen prostřednictvím fosforylace transkripčního regulátoru a jeho následnou aktivaci. Toto je případ AgrA/AgrC signální dráhy u *S. aureus* aktivované autoinduktorovým peptidem AIP (DOWELL, *et al.*, 2001).

Běžná je také přítomnost více quorum sensing drah u jednoho druhu. Tyto dráhy mohou být jak paralelní, tak i kompetitivní (tj. vzájemně se negativně ovlivňující). Například u *V. harveyi* jsou popsány tři paralelní dráhy tohoto typu. Naproti tomu u *B. subtilis* jsou dvě vzájemně se inhibující dráhy (JAYARAMAN a WOOD, 2008).

Co se týče úlohy quorum sensing v biofilmech, jeho role je u různých druhů odlišná. U *V. cholerae* a *S. aureus* je tvorba biofilmu blokována signalizačními molekulami zprostředkovávajícími quorum sensing (YARWOOD, *et al.*, 2004; ZHU a MEKALANOS, 2003). Při aktivaci ArgA dojde k inhibici buněčné adheze a sníží se tím jak přichytávání planktonních buněk k podkladu a následná tvorba biofilmu, tak i soudržnost buněk v již maturovaném biofilmu a následuje disperze buněk z biofilmu (BOLES a HORSWILL, 2008). U *P. aeruginosa* je aktivace quorum sensing drah aktivační i inhibiční pro tvorbu

biofilmu a závislosti na dalších podmínkách prostředí, zejména na množství a kvalitě živin v médiu (DE KIEVIT, 2009; PUREVDORJ, *et al.*, 2002; SAKURAGI a KOLTER, 2007).

Další signály

Z dalších signálních drah regulujících tvorbu biofilmu je třeba zmínit dráhu využívající druhého posla cyklické di-GMP, které se účastní tvorby biofilmů, virulence a přepínání pohyblivé a usedlé formy u mnoha druhů Gram-negativních bakterií (MILLS, *et al.*, 2011). Mechanismus tohoto účinku je dosti nejasný a alespoň částečně spočívá v aktivaci syntézy extracelulární matrix. Bylo ukázáno, že c-di-GMP aktivuje transkripci faktorů nezbytných pro tvorbu biofilmu (např. genu *vspT* u *V. cholerae* nebo *csgD* u *Salmonella typhimurium*), a dále že se c-di-GMP zřejmě přímo váže na enzymatické komplexy celulóza synthasy, alginát synthasy a komplex syntetizující exopolysachrid PEL, které syntetizují hlavní složky extracelulární matrix (KARATAN a WATNICK, 2009). Navíc bylo nalezeno několik ribospínačů („riboswitch“), které mají vysokou afinitu k c-di-GMP, což naznačuje další možnosti regulace genové exprese tímto ligandem (SMITH, *et al.*, 2010).

Dalším metabolickým signálem regulujícím tvorbu biofilmu je indol – produkt degradace tryptofanu za podmínek hladovění. U Gram-negativních bakterií včetně *E. coli*, *Haemophilus influenzae* nebo *Klebsiella oxytoca* indol indukuje tvorbu biofilmu (MARTINO, *et al.*, 2003). Děje se tak dokonce i u *P. aeruginosa*, která neokáže indol produkovat a reaguje na indol produkovaný jinými bakteriemi (LEE, *et al.*, 2007). Jedná se o další příklad mezidruhově signalizace, což je mezi mikroorganismy poměrně častý jev. Jiným příkladem metabolické signalizace jsou polyaminy, které zesilují tvorbu biofilmů u *V. cholerae*, *Yersinia pestis* a *Agrobacterium tumefaciens* (KARATAN, *et al.*, 2005; MATTHYSSE, *et al.*, 1996; PATEL, *et al.*, 2006). Induktorem tvorby biofilmu u patogenních bakterií může být také signál od hostitelského organismu jako u *P. aeruginosa*, která indukuje produkci extracelulární matrix jako odpověď na peroxid vodíku, produkt obrané reakce imunitního systému (MATHEE, *et al.*, 1999).

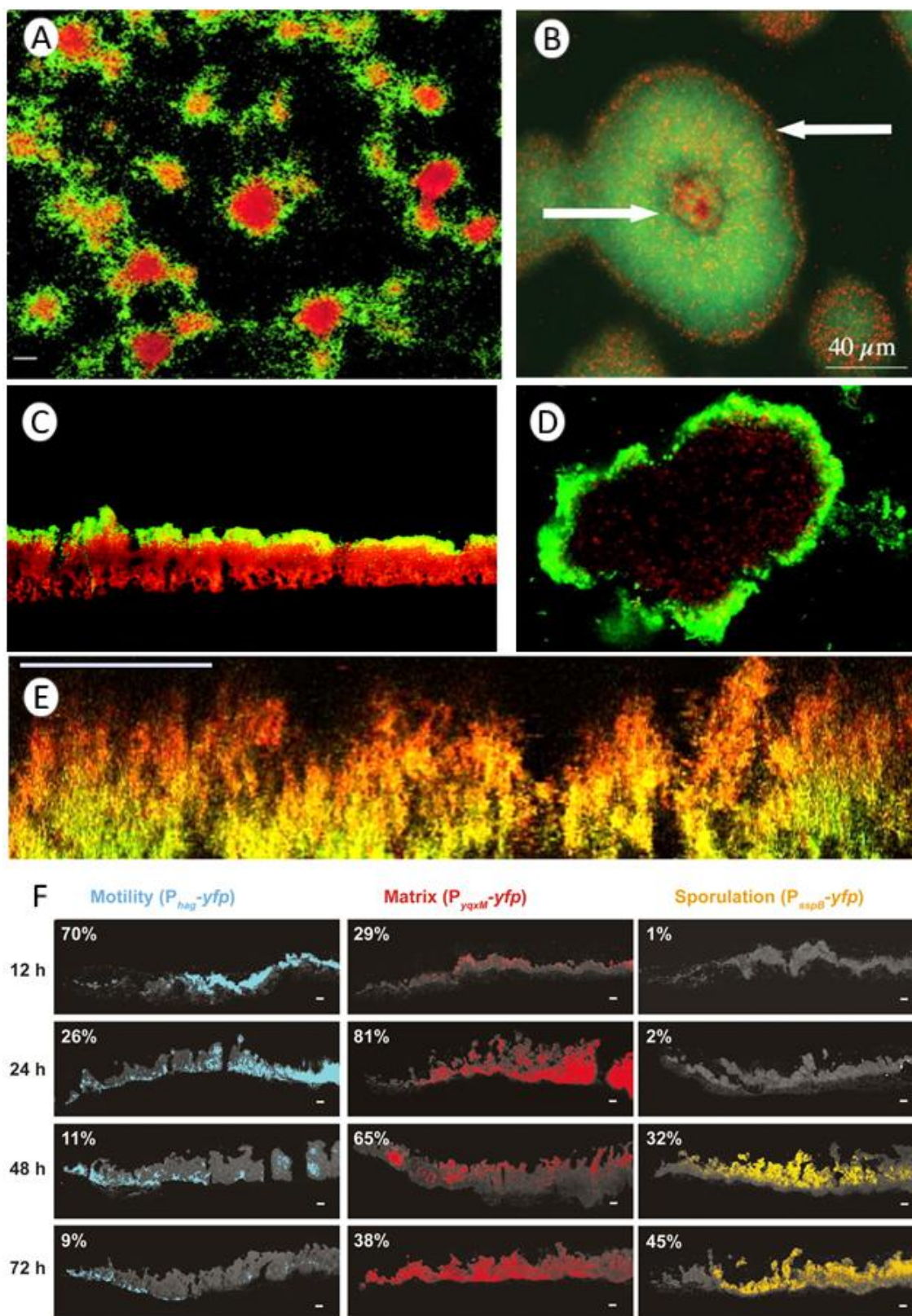
Mnoho bakteriálních druhů produkuje antibiotika a další produkty sekundárního metabolismu. Tradičně je produkce antibiotik považována za vlastnost udělující svému nositeli výhodu tím, že zpomalí růst nebo zabije okolní bakterie, které představují konkurenci. Nedávno bylo zjištěno, že téměř všechna antibiotika a jiné sekundární metabolity v subinhibičních koncentracích ovlivňují transkripci u mnoha testovaných

druhů (DAVIES, *et al.*, 2006). Alespoň některé z těchto molekul mají také vliv na tvorbu biofilmů. Příkladem je indukce tvorby biofilmu u *P. aeruginosa* subinhibiční koncentrací tobramycinu (HOFFMAN, *et al.*, 2005). Antibiotika tam mohou být považována do určité míry za signalizační molekuly.

3.1.1.2 Disperze biofilmu

Život v biofilmu je pro bakterie výhodný, pokud nastanou určité podmínky, a v takovém případě je spuštěna tvorba biofilmu. Za jiných podmínek ale může být výhodnější pro bakterie přejít zpět k planktonní formě života. Pokud takové podmínky nastanou, musí dojít k uvolnění alespoň části buněk do vodního prostředí procesem zvaným disperze.

Obr. 2 na následující straně - A) Řez mikrokolonií v diferencovaném biofilmu *P. tunicata*. Červená fluorescence ukazuje mrtvé buňky ve středu mikrokolonií obarvené propidium jodidem, zelená fluorescence barviva BacLight LIVE/DEAD ukazuje živé a metabolicky aktivní buňky na okrajích mikrokolonií. Převzato z (MAI-PROCHNOW, *et al.*, 2004). B) Řez mikrokolonií v 7 denním biofilmu *P. aeruginosa* 3A po stejném barvení jako A). Šipky ukazují mrtvé buňky v centru a na povrchu mikrokolonie. Převzato z (KIROV, *et al.*, 2007). C) Vrstvy na řezu biofilmu *S. aureus*. Horní vrstva se zelenou fluorescencí ukazuje místa syntézy DNA a tedy buněčného dělení. Je značená Br-dUTP a následně fluorescenční protilátkou anti-Br-dU konjugovanou s Alexa Fluor 488. Spodní vrstva je barvená Rhodaminem B. Převzato z (RANI, *et al.*, 2007). D) Řez mikrokolonií v 3 denním biofilmu *M. mediterranea*. Převzato z (MAI-PROCHNOW, *et al.*, 2008). Fluorescenční barvení stejné jako A) a B). E) Řez biofilmem *Shewanella oneidensis* exprimujícím zelený fluorescenční protein indukovatelný pomocí IPTG. Červená fluorescence barviva SYTO63 zobrazuje celý biofilm. Převzato z (SAVILLE, *et al.*, 2011). F) Exprese specifických proteinů značených žlutým fluorescenčním proteinem v biofilmu *B. subtilis* v průběhu růstu 12-72 hodin. Vlevo exprese proteinu Hag jako markeru buněčné motility. Uprostřed exprese proteinu YqxM jako markeru produkce extracelulární matrix. Vpravo exprese proteinu SspB jako markeru sporulace. Převzato z (VLAMAKIS, *et al.*, 2008).



Disperze někdy nastává, pokud biofilm doroste přílišné tloušťky a další růst by zhoršil podmínky uvnitř biofilmu (nedostatek živin, nahromadění metabolitů). Disperze je regulovaným procesem, který závisí na řadě signálů z okolního prostředí. V první řadě to jsou opět živiny a opět se zde setkáváme s případy, kdy disperze je indukována buď nedostatkem živin, nebo jejich hojností. První případ reprezentuje biofilm *Pseudomonas putida*, u kterého dojde k uvolnění buněk z maturovaného biofilmu v průtokové komůrce krátce po zastavení proudění média (GJERMENSEN, *et al.*, 2005). Opačným příkladem je příbuzný druh *P. aeruginosa*, kde dojde k disperzi biofilmu po zvýšení koncentrace uhlíkového nebo dusíkového zdroje v médiu (SAUER, *et al.*, 2004). Zajímavé je, že podobný efekt byl pozorován i u *P. putida*, kde je tedy disperze indukována jak nedostatkem, tak přebytkem živin a existence ve formě biofilmu nastává jen při určitém rozmezí dostupnosti živin. U *Shewanella oneidensis* je disperze biofilmu regulována koncentrací kyslíku. Při jeho nedostatku dochází k uvolnění buněk z biofilmu (THORMANN, *et al.*, 2005). Podobně bylo zjištěno, že oxid dusnatý, produkt anaerobního metabolismu u *P. aeruginosa*, indukuje disperzi (BARRAUD, *et al.*, 2006).

Nejčastěji je disperze zprostředkována hydrolytickými enzymy, které degradují extracelulární matrix a tím uvolní buňky z biofilmu, a dále indukcí pohyblivosti buněk (KARATAN a WATNICK, 2009). V některých případech (u *P. aeruginosa* nebo *Pseudoalteromonas tunicata*) dochází k lokalizované lyzi spodní vrstvy buněk v biofilmu, což vede k uvolnění horní vrstvy biofilmu a také určitého množství živin, které poslouží přeživším buňkám jako zdroj energie pro další kolonizaci po disperzi (MAI-PROCHNOW, *et al.*, 2004; WEBB, *et al.*, 2003).

3.1.1.3 Diferenciace v biofilmu

Buňky rostoucí v biofilmu jsou rozdílné nejen od buněk rostoucích v planktonní kultuře, ale i od sebe navzájem. V biofilmech nalézáme různé subpopulace buněk lišících se fyziologickými vlastnostmi. Příkladem jsou subpopulace persistentních buněk, sporulujících buněk, kompetentních buněk atd. (STEWART a FRANKLIN, 2008). Biofilmy často tvoří vrstvy složené z rozdílně metabolicky aktivních buněk, mikrokolonie oddělené větším množstvím extracelulární matrix, množství kanálků atd. Například u mořské bakterie *P. tunicata* je biofilm tvořen kulovitými mikrokoloniami uzavřenými v extracelulární matrix (obr. 2). V mikrokoloniích byla pozorována diferenciace na mrtvé buňky uvnitř mikrokolonií a živé a metabolicky aktivní buňky na

jejich povrchu (MAI-PROCHNOW, *et al.*, 2004).

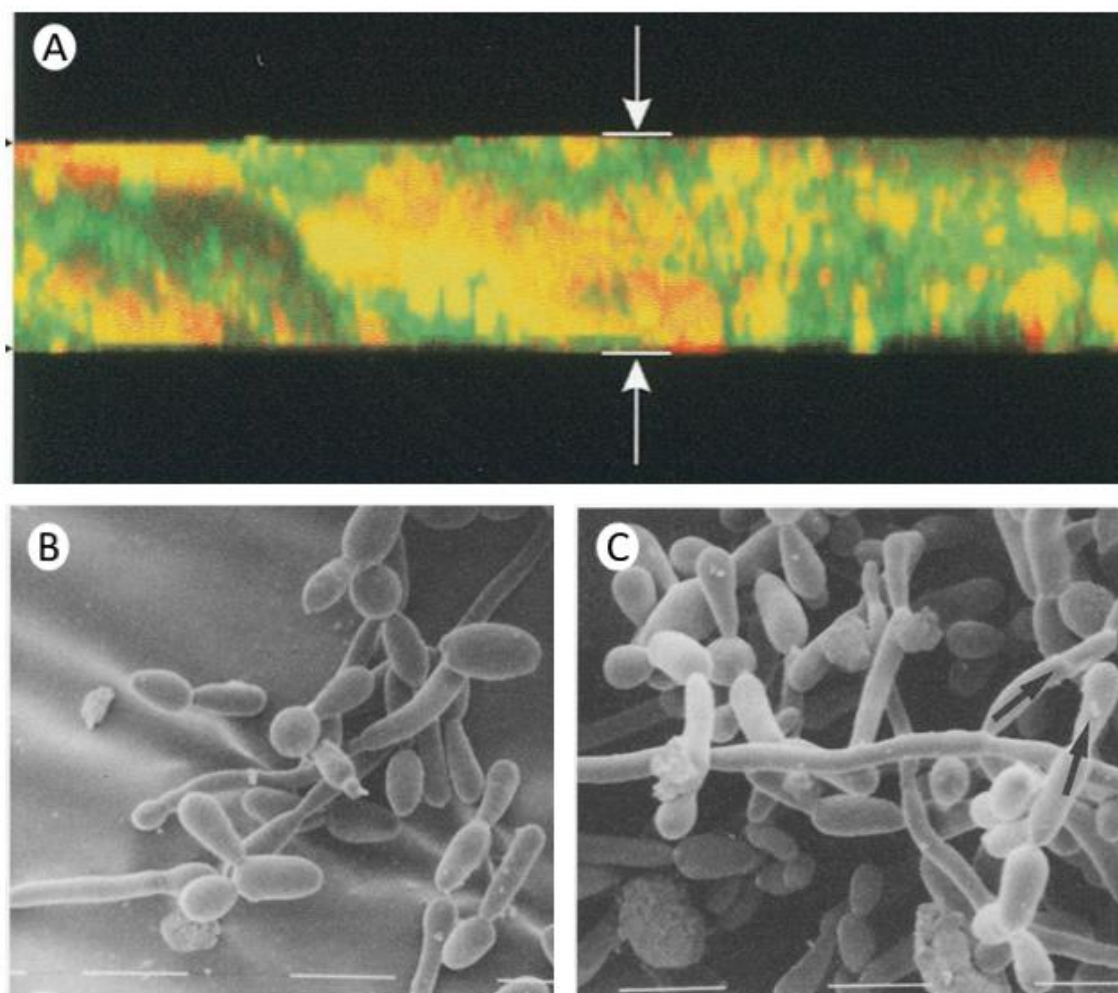
3.1.2 Kvasinkové biofilmy

Schopnost tvorby biofilmů byla pozorována i u kvasinek. Biofilmy tvořené kvasinkami jsou nejvíce prostudované u patogenní kvasinky *Candida albicans*. Tvorba biofilmu vede, podobně jako u bakteriálních biofilmů, ke zvýšené rezistenci k účinkům fungicidních léčiv (MARTINEZ a CASADEVALL, 2006) a proto studium regulace a fyziologie biofilmu je předmětem zájmu medicínského a farmaceutického výzkumu. Tvorba biofilmu a buněčná adheze byly popsány také u několika vinařských izolátů kvasinky *Brettanomyces bruxellensis* (JOSEPH, *et al.*, 2007). U patogenní kvasinky *Cryptococcus neoformans* byla také prokázána tvorba biofilmů. Jejich tvorba byla ovlivněna uhlíkovým zdrojem v médiu, hodnotou pH média, teplotou kultivace a povrchovými vlastnostmi podkladového materiálu (MARTINEZ a CASADEVALL, 2007). Buňky v biofilmu jsou méně náchylné k různým stresovým faktorům jako je vysoká nebo nízká teplota a UV záření.

3.1.2.1 Biofilm *C. albicans*

Hlavním modelem biofilmového uspořádání u kvasinek je oportunistický patogen *Candida albicans*. Ta, právě ve formě biofilmů na katetrech, kloubních implantátech a podobných lokacích, způsobuje těžko léčitelné infekce u imunosuprimovaných pacientů. Studium biofilmů *C. albicans* není zdaleka tak daleko, jako je tomu u bakteriálních biofilmů, také díky obtížím s genetickými a molekulárními metodami u tohoto druhu. Biofilm *C. albicans* je tvořen všemi morfologickými buněčnými variantami, mezi nimiž je tento kvasinkový druh schopný přecházet: kvasinkovými buňkami, klíčovými kvasinkovými buňkami („germ tubes“), pseudohyfami i hyfami, které jsou spojené extracelulární matrix (obr. 3) (HAWSER a DOUGLAS, 1994). Vnitřní struktura a morfologie biofilmu závisí na druhu podkladového materiálu a na kultivačním médiu. Při růstu na minimálním glukosovém médiu je biofilm tvořen převážně kvasinkovou formou, naproti tomu při růstu na médiu pro lidské tkáňové kultury je biofilm tvořen především pseudohyfami a hyfami. Oba typy biofilmu dosahují stejného maximálního nárůstu, což naznačuje, že tvorba hyf není nutná pro tvorbu biofilmu, alespoň za určitých podmínek. Mutace způsobující ztrátu schopnosti

tvořit hyfy (mutace v genech *EFG1*, *CPH1*, *KEM1*, *MDS3*, *NUP85*, *SUV3*) vedou ovšem k narušení vývoje biofilmu (LEWIS, *et al.*, 2002; RICHARD, *et al.*, 2005).



Obr. 3 - Biofilm *C. albicans*. A) Řez biofilmem obarveným barvivou FUN-1 pro zobrazení metabolicky aktivních buněk (červeně) a ConA pro obarvení extracelulární matrix (zelené). Převzato z (CHANDRA, *et al.*, 2001). B) 18 a C) 48 hodin starý biofilm *C. albicans* obsahuje jak kvasinkové buňky, tak pseudohyfy a pravé hyfy. Převzato z (HAWSER a DOUGLAS, 1994).

Iniciace tvorby biofilmu je, jako u bakteriálních biofilmů, závislá na adhezi planktonních buněk k podkladu. V případě *C. albicans* dochází k adhezi pouze kvasinkových buněk, z nichž se již po několika hodinách tvoří klíčky a po 24 hodinách je biofilm tvořen spleť pseudohyf a hyf (HAWSER a DOUGLAS, 1994). Maturovaný biofilm je vysoce heterogenní struktura. Při růstu na hladkém povrchu (silikonový elastomer) dochází k vertikální diferenciaci na spodní vrstvu tvořenou kvasinkovými buňkami a na horní vrstvu, která je tvořena pseudohyfy a hyfy. V biofilmu rostoucím na hrubém povrchu (polymethylmethakrylát) byly zase pozorovány oblasti

bohaté na extracelulární matrix střídané oblastmi bohatými na buňky s menším nebo větším množstvím extracelulární hmoty (obr. 3) (CHANDRA, *et al.*, 2001).

Biofilm *C. albicans* je, podobně jako bakteriální biofilmy, resistantní k působení antimikrobiálních činidel, především azolových derivátů používaných v klinické praxi k léčení kandidóz. Rezistence k flukonazolu je patrná již dvě hodiny po přichycení planktonních buněk k podkladu a je závislá na přítomnosti membránových pump z rodiny transportérů mnohočetné lékové rezistence Mdr1p, Cdr1p a Cdr2p (CHANDRA, *et al.*, 2001; MATEUS, *et al.*, 2004). Je zajímavé, že tyto transportéry přispívají k resistenci pouze v počátečním stádiu vývoje biofilmu (tj. krátce po přichycení) a nemají význam v maturovaném biofilmu, kde je mechanismus rezistence neznámý (RAMAGE, *et al.*, 2002a). Určitou úlohu by mohla sehrát extracelulární matrix, změny složení membrány a buněčné stěny, případně jiné exportní systémy. V biofilmu se také vytváří vysoce resistantní subpopulace buněk zvaná persistenti („persisters“), což je známý a dobře popsáný fenomén u bakteriálních biofilmů (GARCIA-SANCHEZ, *et al.*, 2004; LAFLEUR, *et al.*, 2006).

Fyziologie buněk žijících v biofilmu byla zkoumána na transkriptomové úrovni pomocí DNA čipů. Prosté porovnání transkriptomu biofilmu a planktonní populace po 72 hodinách růstu a buněk stejně starého biofilmu bylo nalezeno 352 genů s rozdílnou expresí (GARCIA-SANCHEZ, *et al.*, 2004). Geny indukované v biofilmu se podílely na translaci, metabolismu aminokyselin, nukleotidů a lipidů a také syntéze buněčné stěny. Ve studii byly porovnávány biofilmy i planktonní populace rostoucí za různých podmínek, ale transkriptomové profily byly podobné pro biofilmy na jedné straně a planktonní populaci na straně druhé. To ukazuje na existenci specifického biofilmového transkripčního programu. Velká část těchto genů je pod kontrolou transkripčního faktoru *GCN4*, hlavního regulátoru aminokyselinového metabolismu, a kmen s delecí v tomto genu tvořil biofilm s výrazně sníženou biomasou (GARCIA-SANCHEZ, *et al.*, 2004).

V jiné studii byly porovnávány transkripty během vývoje biofilmu v časech krátce po přichycení k podkladu (6 hodin), ve fázi růstu a vývoje biofilmu (12 hodin) a u maturovaného biofilmu (48 hodin) (YEATER, *et al.*, 2007). V prvním čase byla vysoká exprese genů aminokyselinového metabolismu, glykolýzy, stresové odpovědi a syntézy nejrůznějších buněčných komponent (DNA, lipidů, buněčné stěny), které pravděpodobně souvisí s rychlým růstem biofilmu v počáteční fázi. V pozdějších časech

se exprese těchto metabolických genů snižuje a naopak se zvyšuje exprese genů pro transportéry živin (glukosy a aminokyselin) a pro úspornější, respirativní metabolismus. V plně maturovaném biofilmu (48 hodin) již probíhá minimum změn.

Signály regulující vývoj biofilmu C. albicans

Vývoj biofilmu je, podobně jako u bakterií, regulován i u *C. albicans* signálními molekulami zprostředkujícími quorum sensing. První popsanou sekretovanou molekulou s funkcí autoinduktoru u *C. albicans* byl alkohol odvozený od seskviterpenu farnesol, který je produkován všemi buňkami do média a jeho koncentrace je tedy přímo úměrná koncentraci buněk v kultuře (HORNBY, *et al.*, 2001). Přestože neovlivňuje růst *C. albicans*, farnesol inhibuje růst jiných mikroorganismů (DERENGOWSKI, *et al.*, 2009). Kromě toho má ještě autoregulační účinek na buňky *C. albicans*. Inhibuje filamentární růst a také tvorbu biofilmu a naopak zvyšuje resistenci k environmentálním stresům a fungicidům (RAMAGE, *et al.*, 2002b; SATO, *et al.*, 2004; SHARMA a PRASAD, 2011).

Další signální molekulou s vlastnostmi autoinduktoru je u *C. albicans* aromatický alkohol tyrosol, který je produktem degradace aromatických aminokyselin (CHEN, *et al.*, 2004). Jeho efekt na tvorbu biofilmu a filamentární růst je pozitivní, tedy opačný než u farnesolu (ALEM, *et al.*, 2006). Tyto dvě signální molekuly jsou tedy antagonistické ve svém účinku. Na rozdíl od farnesolu, je ale produkce tyrosolu silně závislá na kultivačních podmínkách, především na přítomnosti aromatických aminokyselin a dále pak na okolním pH a přítomnosti kyslíku a amonných solí (GHOSH, *et al.*, 2008).

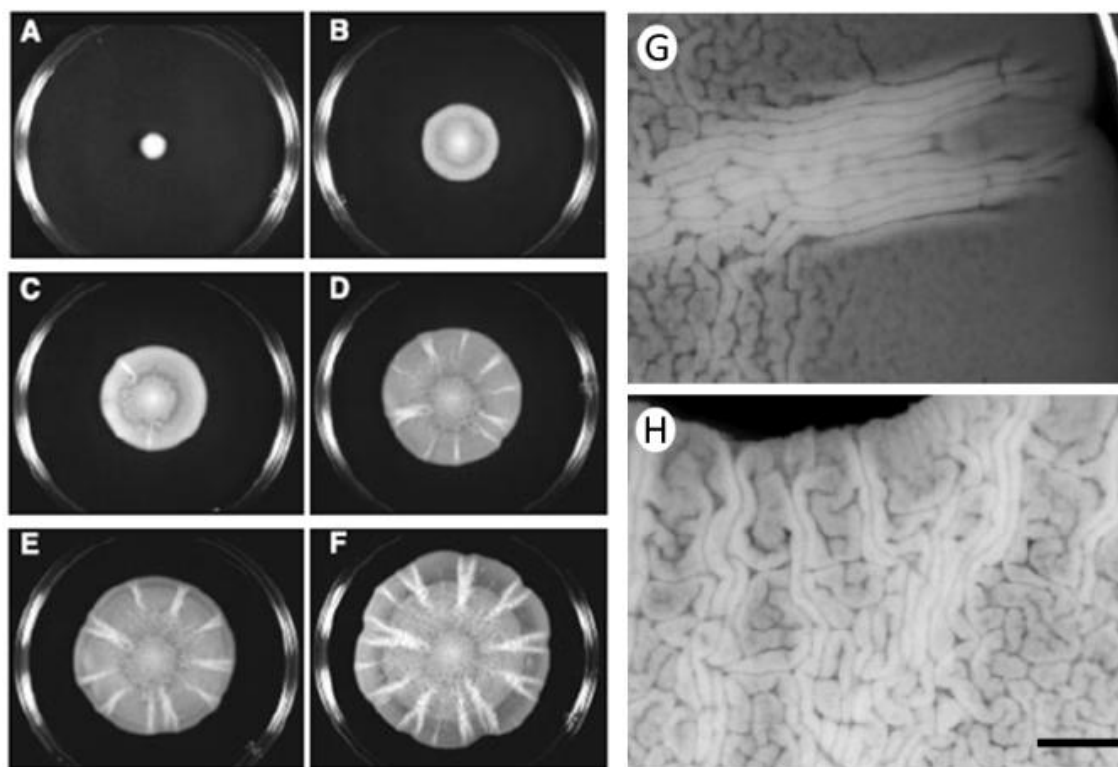
Aromatické alkoholy fenylethanol a tryptofol jsou produkovány také u *Saccharomyces cerevisiae* jako produkt degradace aromatických aminokyselin a také zde mají regulační funkci. V koncentracích nad 20 μ M indukují na médiu s chudým zdrojem dusíku tvorbu pseudohyf a invazivní růst (CHEN a FINK, 2006).

3.2 Mnohobuněčné struktury *Saccharomyces cerevisiae*

U hlavního kvasinkového modelu *S. cerevisiae* nebyla tvorba biofilmu (ve smyslu vrstvy potahující abiotický materiál na styku s vodním prostředím) pozorována, a to ani u klinických izolátů (*S. cerevisiae* byla v několika případech klinicky izolována a je proto považována za extrémně výjimečného patogena). Dochází sice k adhezi buněk

k abiotickému materiálu jako polystyren, polypropylen nebo PVC, ale nedochází na těchto površích k tvorbě biofilmu (BRUCKNER a MOSCH, 2012; ZARA, *et al.*, 2010). Tvorba biofilmu byla pozorována pouze ve speciálních případech jako u sardinského vinařského kmene, smíšeného biofilmu u pivovarského kmene *S. cerevisiae* a bakterie *Lactobacillus plantarum* nebo kmene pro výrobu saké a *Lactobacillus casei* (FURUKAWA, *et al.*, 2011; KAWARAI, *et al.*, 2007; ZARA, *et al.*, 2010). Adheze k pevným povrchům závisí na koncentraci glukosy. Při vyšších koncentracích je adheze nižší než při nižších koncentracích. Diploidní kmen má výraznější povrchovou adhezi než isogenní haploidní kmeny obou párovacích typů (BRUCKNER a MOSCH, 2012).

Za adhezi k povrchu jsou zodpovědné povrchové proteiny z rodiny adhesinů a flokulinů. Mezi nimi je nejdůležitějším zástupcem Flo11p, jehož delece vede ke ztrátě adhesivity. Podobný efekt má i delece *FLO8*, transkripčního regulátoru genu *FLO11* (FICHTNER, *et al.*, 2007; PALECEK, *et al.*, 2000). Za biofilm nebo biofilmu podobný mnohobuněčný útvar mohou být považované kolonie tvořené na pevném médiu nebo povlaky („mats“) tvořené na polopevném médiu.



Obr. 4 - Povlaky *S. cerevisiae* na polopevném médiu. A-F) Povlak („mat“) tvořený *S. cerevisiae* 2-11 den. Převzato z (REYNOLDS a FINK, 2001). G), H) detaily kabelovitých svazků tvořících povlak.

3.2.1 Povlaky *S. cerevisiae*

Povlaky jsou tvořeny na velmi řídkém agarovém médiu (0,3% agar), kde se po inokulaci buněčné suspenze vytvoří tenký povlak, který se rychle rozšiřuje (obr. 4) (REYNOLDS a FINK, 2001). Plocha, kterou povlak zabírá, je mnohem větší než plocha zabraná kolonií rostoucí na standardním 2% agarovém médiu. Povlak je diferencovaná struktura, kde střed je tvořen útvary připomínajícími spleť kabelů nebo špaget a okraj tvoří vyvýšený val, který se posouvá do stran s tím, jak povlak roste. Růst buněk je přitom soustředěn především do okrajového valu. Schopnost tvorby povlaku závisí na přítomnosti proteinu Flo11p a morfologie povlaku se mění v závislosti na viskozitě a pH média, obsahu živin a ploiditě použitého kmene (REYNOLDS, *et al.*, 2008). Haploidní kmeny tvoří větší a více strukturované povlaky než diploidní isogenní kmeny a případně kmeny s vyšší ploidií. Zvýšená koncentrace glukosy způsobuje opoždění tvorby povlaku. Populace roste delší dobu ve formě kolonie a pravděpodobně až po vyčerpání glukosy nastává rozpínavý růst povlaku. Přidání glukosy k rostoucímu povlaku do jamky v médiu vede ke změně morfologie síťování povlaku na té straně, kam byla přidána glukosa. Následně se ukázalo, že kmeny s delecí v některém z genů, jejichž produkty se účastní glukosové signalizace (*SNF1*, *YAK1*, *RAS2* jako zástupci hlavních drah snímajících glukosu) mají také narušenou schopnost tvorby povlaků. Podobně zvýšení pH použitím pufovaného média vede k vytvoření útvaru spíše podobného kolonii než povlaku (REYNOLDS, *et al.*, 2008).

3.2.1.1 Úloha flokulinů při tvorbě povlaků

Většina těchto závislostí se dá vysvětlit regulací genu *FLO11* za těchto podmínek (REYNOLDS, *et al.*, 2008). Gen *FLO11* se ukázal být reprimován glukosou a zvýšenou ploidií, stejně jako je jeho exprese zvýšená v kmenech s narušenou glukosovou signalizací. Zvýšené pH zase pravděpodobně redukuje adhezivní vlastnosti Flo11p. Rozdílná exprese *FLO11* byla zaznamenána mezi středem povlaku a okrajovým valem. Ve středu je exprese vyšší než na okraji valu. Mechanismus působení Flo11p pravděpodobně spočívá v klouzavém pohybu buněk zprostředkovaném vysoce glykosylovaným Flo11p, podobně jako je tomu u klouzavého pohybu některých bezbičíkatých bakterií pomocí povrchových glykopeptidolipidů. Tyto proteiny propůjčují buněčným povrchům hydrofóbní vlastnosti díky nimž se buňky shlukují

k sobě nebo k jinému hydrofobnímu předmětu (plastové povrchy) a také snáze kloužou po agaru, což umožňuje rychlejší posouvání okraje kolonie do stran; kolonie neroste do výšky, ale spíše do šířky. Zajímavé je, že *FLO11* je jako jediný z pětičlenné rodiny flokulinů rozdílně exprimován mezi okrajem a středem povlaku. Ostatní flokuliny (*FLO1*, *FLO5*, *FLO9* a *FLO10*) jsou transkripčně neaktivní za podmínek studovaných u povlaků a ani jejich delece nevede k narušení tvorby povlaků (REYNOLDS, *et al.*, 2008).

Exprese *FLO11* je sice nezbytným faktorem pro tvorbu povlaků, nicméně není faktorem jediným ani dostačujícím. Jako klíčová se ukázala úloha molekulárních chaperonů rodiny Hsp70 a jejich kofaktorů Fes1p, Sse1p a Ydj1p (MARTINEAU, *et al.*, 2007). Delece v některém z těchto genů způsobuje zablokování tvorby povlaků. Vliv delece genů pro chaperony rodiny Hsp70, v *S. cerevisiae* zastoupené geny *SSA1-4*, byl různý. Delece *SSA3* a *SSA4* vedla jen k mírnému narušení morfologie povlaků, delece *SSA2* měla již výraznější fenotyp a delece *SSA1* vedla prakticky k zastavení tvorby povlaku. Ani jedna ze zmíněných delecí nevedla ke snížení exprese *FLO11*. Mechanismu účinku chaperonů na tvorbu povlaků není znám.

3.2.2 Kolonie *S. cerevisiae*

Kolonie je tvořena buňkami rostoucími na pevném živném médiu. Vznik kolonii může dát jediná buňka, v tom případě vznikne mikrokolonie (monokolonie), nebo je základem pro kolonii kapka buněčné suspenze – v tom případě se jedná o obří kolonii. Růst v kolonii probíhá jiným způsobem než v tekutém médiu. Buněčný růst je limitován omezenou rychlostí difúze živin z okolí, což je faktor, který se u třepaných tekutých kultur nevykazuje. Růst kolonií vykazuje jiné charakteristiky než růst v tekutém médiu. Při růstu na zkvasitelném zdroji uhlíku je růst tekuté kultury dvojfázový. V první fázi dochází k rychlému růstu pomocí glykolýzy, kdy je glukosa přeměňována na ethanol, který je vylučován do média. Po vyčerpání glukosy dojde k přeprogramování metabolismu na respirativní a zdrojem energie se stává ethanol vyloučený během glykolytické fáze růstu. Růst se v této fázi zpomalí, dokud nedojde k vyčerpání všech živin a kultura pak vstupuje do stacionární fáze, kdy se hustota kultury již nemění. Přechod mezi fermentativní a respirativní fází růstu se nazývá diauxické přepnutí („diauxic switch“). Dvoufázový růstový křivka byla pozorována i u kolonií (MEUNIER a CHODER, 1999). V tomto případě ale není příčinou růstového přepnutí změna

metabolismu z fermentativního na respirativní, protože stejná přepnutí bylo pozorováno i u respirativně deficientního kmene. Během fázového přepnutí dochází v koloniální populaci k dramatickým změnám. Prudce se snižuje počet buněk procházejících buněčným cyklem a snižuje se i obsah rRNA a mRNA v buňkách. Růst probíhá především na okraji kolonií, zatímco buňky uvnitř kolonie vstupují do klidového stavu. Signál zajišťující přechod mezi rychlou a pomalou fází růstu není znám. Prosté zvýšení živin nemá na přepnutí vliv, a proto zde musí fungovat i jiné signalizační mechanismy než pouhé vyčerpání živin.

3.2.2.1 Amoniaková signalizace v kvasinkových koloniích

Kolonie *S. cerevisiae*, ale i jiných kvasinek, jsou schopné při růstu na některých médiích (jedná se především o média s nefermentovatelným zdrojem uhlíku) po určité době růstu alkalizovat okolní médium (obr. 5) (PALKOVÁ, *et al.*, 1997). Tato fáze růstu kolonie se nazývá alkalická fáze a pH okolního média dosahuje pH 6,5-7,5 v závislosti na intenzitě alkalizace. Alkalizace média nastává až po určité době růstu, kdy je pH média acidické (cca pH 5). Doba nástupu alkalizace a její intenzita závisí na hustotě výsevu kolonií, kvasinkovém druhu, složení média a je doprovázena uvolňováním plynného amoniaku. Uvolněný amoniak nese znaky signální molekuly (PALKOVÁ a FORSTOVÁ, 2000):

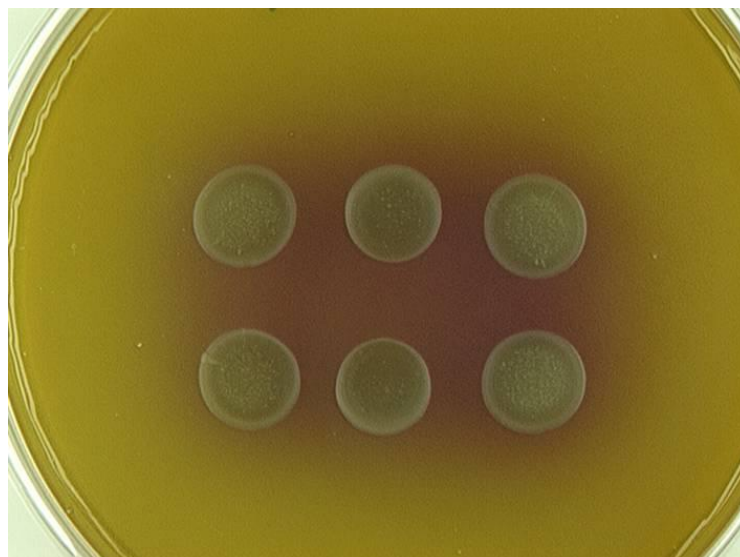
- 1) amoniak se začíná produkovat v místech nejhustšího výskytu kolonií a postupně se šíří do ostatních oblastí
- 2) produkci amoniaku je v kolonii možné naindukovat tím, že ji vystavíme působení umělého zdroje amoniaku
- 3) kolonie neschopné amoniakové produkce vykazují specifické fyziologické charakteristiky (viz níže a výsledky)

Produkce amoniaku je závislá na přítomnosti aminokyselin v médiu a také na přítomnosti transportérů aminokyselin (ŽIKANOVÁ, *et al.*, 2002). Vstup do alkalické fáze růstu spojené s uvolňováním amoniaku je doprovázen rozsáhlými změnami v transkripci, jak bylo prokázáno analýzou transkriptomu metodou microarrays (PALKOVÁ, *et al.*, 2002). V tomto experimentu byl detailně studován přechod do alkalické fáze růstu v šesti časových bodech mezi 7.-12. dnem růstu. Získané výsledky odhalily významné změny především v genech účastnících se metabolismu, stresové odpovědi a transportu přes plasmatickou membránu.

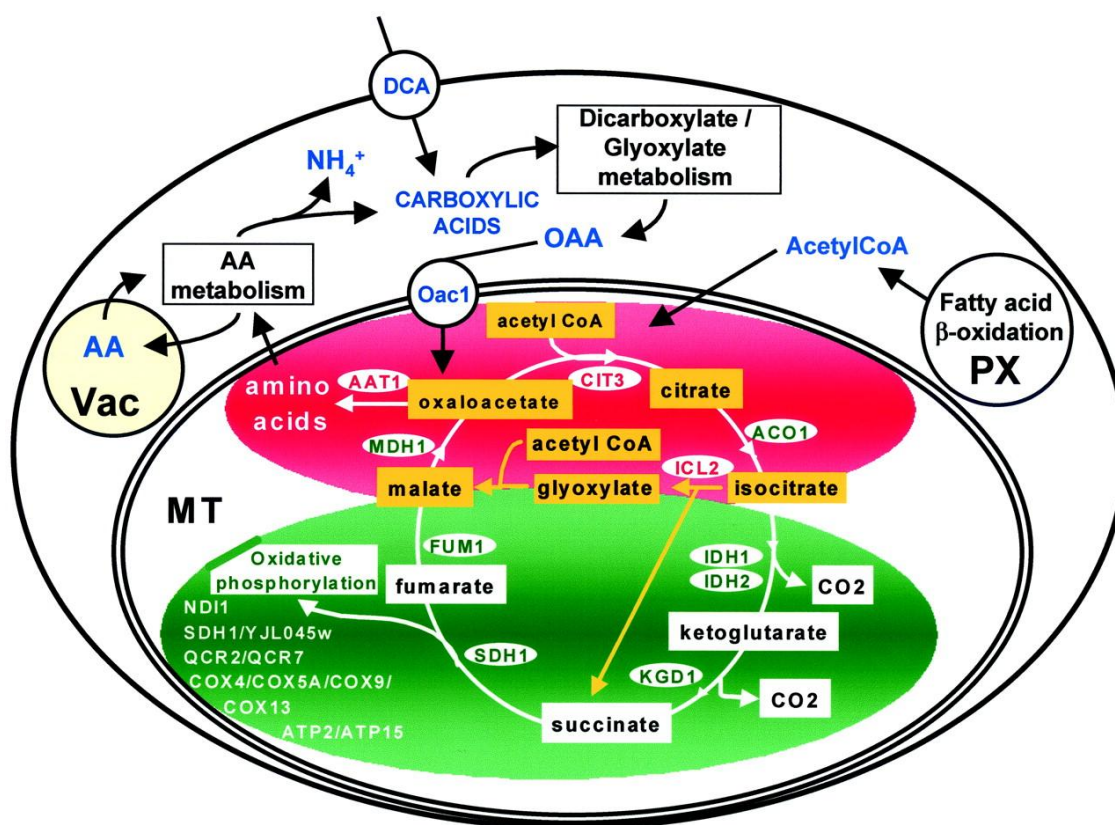
Expresní změny během vývoje kolonie (obr. 7)

Nejvýraznější skupinou genů měnících expresi ve sledovaném intervalu byly geny pro metabolické enzymy, kdy docházelo k represí genů pro citrátový cyklus, oxidativní fosforylaci a další mitochondriální funkce a na druhé straně se indukovala početná skupina genů metabolismu aminokyselin a nukleotidů kontrolovaná transkripčním faktorem Gcn4p a dále peroxisomální oxidace mastných kyselin (např. *POX1*, *POT1*, *FOX2*, *IDP3*) a glyoxylátového nebo methylglyoxylátového cyklu (*CIT3*, *ICL2*) (PALKOVÁ, *et al.*, 2002). Tato data svědčí o rozsáhlém přeprogramování metabolismu spojeném s produkcí amoniaku a alkalizací média (obr. 6). Dalším výrazným znakem kolonií v alkalické fázi růstu jsou změny v expresi membránových transportérů. Dochází k represí hexosových transportérů z HXT rodiny a obou paralogů plasmatické protonové pumpy *PMA1* i *PMA2*. Pozoruhodné je, že snížení exprese *PMA1* je typické i pro biofilm *C. albicans* (GARCIA-SANCHEZ, *et al.*, 2004). Zvyšuje se exprese transportérů fosfátových (*PHO84*, *PHO89*), sirných (*SUL1*, *SUL2*) a zinečnatých (*ZRT1*) iontů. Velice silně (až 50x) byla zvýšena exprese tří homologních transmembránových proteinů *YCR010c*, *YNR002c* a *YDR384c*, jejichž funkce nebyla známá. Spolu s dalšími indiciemi, jako je homologie se známými transportéry amonných iontů, bylo navrženo, že zmíněné proteiny jsou transportéry amonných iontů nebo přímo plynného amoniaku ven z buňky a byly nazvány *ATO 1* (*YCR010c*), *ATO2* (*YNR002c*) a *ATO3* (*YDR384c*) (podle ammonium transport outwards).

Paralelně s výše popsánymi expresními změnami dochází během přechodu z acidické do alkalické fáze růstu k represí množství genů účastnících se mitochondriálního energetického metabolismu a také skupiny genů společné stresové odpovědi. Zejména druhé zmíněné je poměrně zajímavé, protože v tekutých kulturách je stárnutí spojeno se zvýšeným stresem a zvýšenou expresí genů stresové odpovědi. Nejvýraznějšími zástupci této skupiny jsou geny *CTT1*, *SOD1* a *CCP1*, které kódují důležité enzymy ochrany před oxidativním stresem cytosolickou katalasou, cytosolickou superoxid dismutasou a mitochondriální cytochrom c peroxidasou. Ty hrají roli při odstraňování reaktivních forem kyslíku (angl.. Reactive Oxygen Species, ROS) jako peroxidu vodíku (*CTT1* a *CCP1*) a dalších peroxidů (*CCP1*) a superoxidového radikálu (*SOD1*). Vypnutí mitochondriálního metabolismu je zřejmě spolu s aktivací peroxisomálního metabolismu, metabolismu aminokyselin a uhlíkového metabolismu součástí širšího metabolického přeprogramování na jiný druh metabolismu.



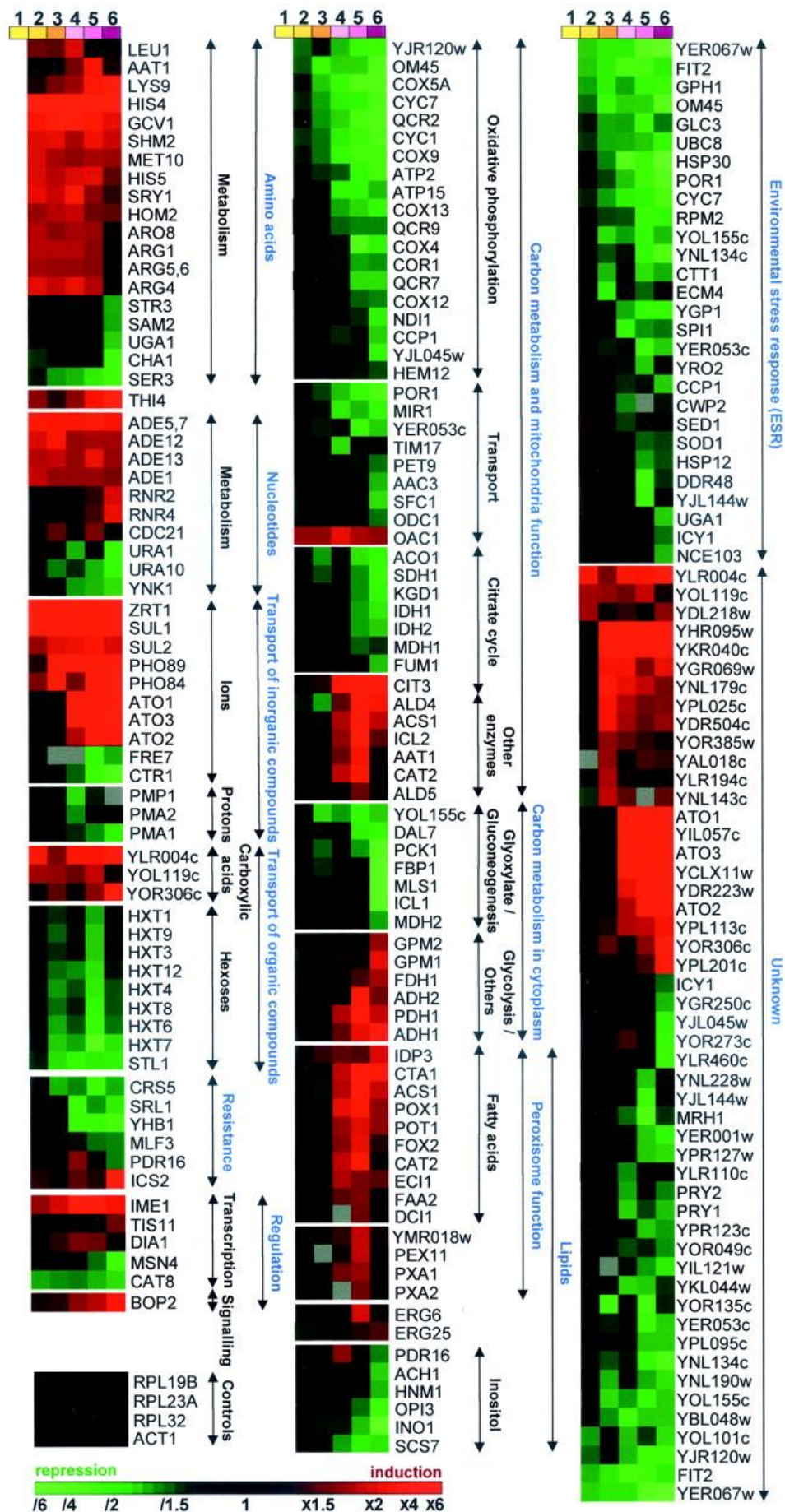
Obr. 5 – Šestice obří kolonií v alkalické fázi růstu. Obří kolonie vzniklé nanesením 10 μ l buněčné suspenze na agarové médium jsou používány jako definovaný model pro studium vývoje kolonií a amoniakové signalizace. V agarovém glycerolovém médiu je přidán pH indikátor bromkresolový purpur, jehož fialové zabarvení značí hodnotu pH nad 6,8.



Obr. 6 - Model metabolických změn v buňkách při přechodu z alkalické do acidické fáze růstu. Dochází k utlumování citrátového cyklu a naopak k indukci glyoxylátového/methylglyoxylátového cyklu. Převzato z (PALKOVÁ, *et al.*, 2002).

Význam amoniakové signalizace se ukázal při studiu kmene s delecí v genu *SOK2*, který není schopný produkovat amoniak (VACHOVA, *et al.*, 2004). Gen *SOK2* byl identifikován jako jeden z genů se zvýšenou expresí při transkriptomové analýze kmene vzniklého náhodnou mutagenezí, který měl výrazně zvýšenou produkci amoniaku. *SOK2* kóduje transkripční faktor účastnící se několika signalizačních drah, především byla popsána jeho funkce v regulaci pseudohyfálního růstu a sporulace (PAN a HEITMAN, 2000; SHENHAR a KASSIR, 2001; WARD, *et al.*, 1995). Transkriptomová analýza odhalila množství změn v koloniích kmene *sok2Δ*, které nejsou schopné vstoupit do alkalické fáze růstu, oproti koloniím rodičovského kmene v alkalické fázi růstu. Zejména se jednalo o metabolické změny, kdy kolonie kmene *sok2Δ* nebyly schopné indukovat hlavní změny popsané při přechodu do alkalické fáze růstu (metabolismus aminokyselin, peroxisomální oxidace mastných kyselin, indukce exprese transportérů včetně *ATO* genů) a dále nedocházelo k represi genů stresové odpovědi pozorované u kolonie divokého kmene při vstupu do alkalické fáze.

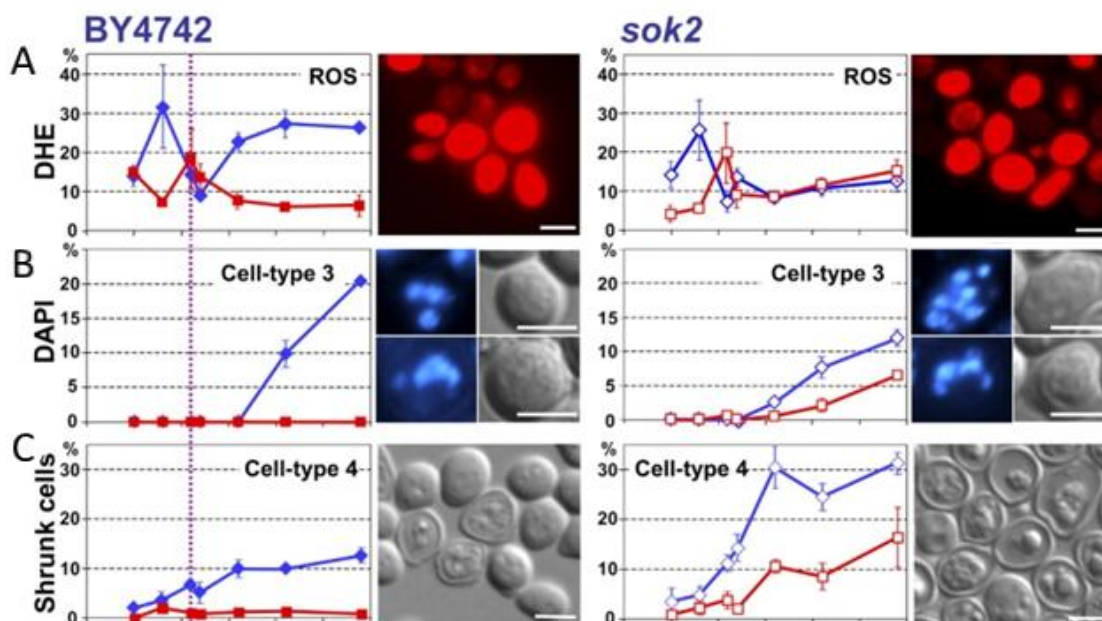
Obr. 7 na následující straně – Expresní změny při přechodu z acidické do alkalické fáze růstu kolonie spojené s produkcí amoniaku. Červená barva značí indukci, zelená represi daného genu podle zobrazené škály. Porovnány byly transkriptomomy ze 6 časových bodů přechodu (1-6). Body 1 a 2 jsou ještě součástí pozdní acidické fáze, bod 6 je již v plné alkalické fázi. Geny jsou rozděleny do skupin podle jejich majoritní funkce. Převzato z (PALKOVÁ, *et al.*, 2002).



3.2.2.2 Diferenciace kolonií *S. cerevisiae*

V koloniích *S. cerevisiae* byla v souvislosti s amoniakovou signalizací studována také diferenciace kolonie v horizontálním směru, tedy mezi okrajem a středem kolonie. Bylo zjištěno, že přibližně od doby, kdy kolonie vstupuje do alkalické fáze růstu a s tím související produkcí amoniaku, dochází k diferenciaci neboli rozrůžňování buněk ve středu kolonie a na jejím okraji (obr. 8) (VACHOVA, *et al.*, 2009; VACHOVA a PALKOVA, 2005). Buňky ve středu kolonie vykazují znaky programované buněčné smrti jako je vysoká produkce ROS a vysoký výskyt buněk s fragmentovanými jádry a také prázdných buněčných torz. Naopak na okraji kolonií je těchto buněk malé množství. Jak kolonie stárne, dochází k stále většímu rozrůžňování okraje a středu kolonie. Umírající buňky ve středu kolonie poskytují živiny pro buňky na okraji kolonie, jak bylo prokázáno v pokusech, kde odstranění středu stárnoucí kolonie zpomalilo růst buněk na okraji kolonie. To jednoznačně dokazuje, že smrt buněk ve středu kolonie je prospěšná pro jiné buňky v kolonii, zejména pro ty, které jsou lépe vybaveny pro přežití a další kolonizaci okolního prostředí tím, že jsou mladší a jsou lokalizované na okraji kolonie (VACHOVA a PALKOVA, 2005).

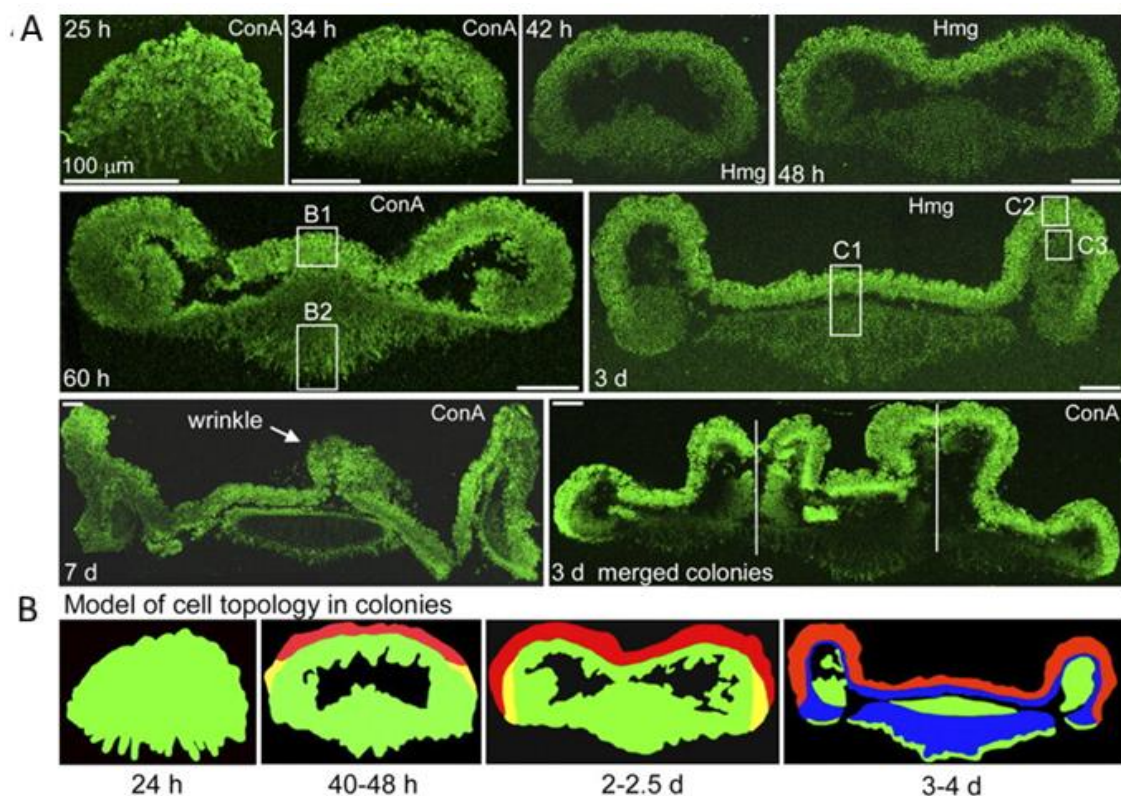
Fyziologické důsledky absence amoniakové signalizace u kolonií kmene *sok2Δ* se výrazně projeví na diferenciaci kolonií u tohoto kmene. Bylo prokázáno, že kmen *sok2Δ* má změněnou lokalizaci buněčné smrti v kolonii (obr. 8) (VACHOVA a PALKOVA, 2005). Nedochozí zde k tak výraznému umírání buněk ve středu kolonie a naopak buňky na okraji kolonie vykazovaly znaky buněčné smrti. V důsledku toho byl okraj kolonie, kde dochází k přírůstku, tvořen až z 25% mrtvými buňkami. Bylo navrženo, že amoniaková signalizace indukuje buněčnou smrt u určité buněčné subpopulace ve středu kolonie a poskytuje tak živiny pro růst buněk okraje kolonie a že tedy amoniaková signalizace je důležitým faktorem pro dlouhodobé přežití kolonií. Nicméně není zcela jasné, jestli je tento jev důsledkem absence amoniakové signalizace, nebo spíše specifickým důsledkem absence pleiotropního transkripčního faktoru Sok2p.



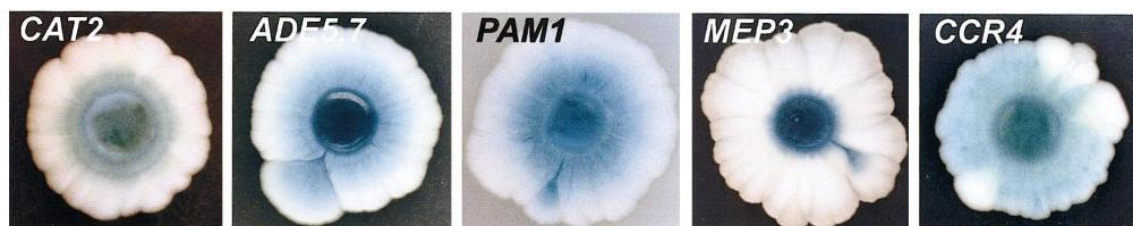
Obr. 8 - Horizontální diferenciace mezi středem (modrá křivka) a okrajem kolonie (červená křivka) v apoptotických znacích u rodičovského kmene a kmene *sok2Δ*. A) produkce ROS měřená jako intenzita fluorescence dihydroethidia, B) jaderná morfologie jako znak probíhající apoptosy, C) výskyt prázdných buněčných obalů. Převzato z (VACHOVA a PALKOVA, 2005).

Diferenciace mezi středem a okrajem kolonie byla zaznamenána i v expresi proteinů (VACHOVA, *et al.*, 2009). Enzymy uhlíkového metabolismu Cit3p a Icl2p stejně jako membránové proteiny Ato1p, Ato2p a Ato3p jsou výrazněji exprimovány na okraji kolonie. Střed kolonie exprimuje vyšší množství enzymů antioxidantní ochrany cytosolické katalasy Ctt1p a mitochondriální a cytosolické superoxid dismutasy Sod2p a Sod1p. Buňky okraje kolonie jsou zároveň schopné produkovat amonné ionty do okolí, když jsou inkubovány *ex situ* v pufru.

Ve strukturovaných koloniích tvořených divokými kmeny *S. cerevisiae* (tj. kmeny izolovanými z přírody) byla zaznamenána při ultrastrukturním studiu diferenciace na několik buněčných typů (obr. 9) (VACHOVÁ, *et al.*, 2011). Horní vrstva je tvořená nedělícími se buňkami, které exprimují transportéry PDR patřící do rodiny transportérů mnohočetné lékové resistance. Tato vrstva by mohla mít ochranný charakter. Pod ní se nacházejí dělící se buňky a v místě kontaktu s agarem kolonie zarůstá do podkladu pomocí „kořínků“ tvořených pseudohyfy.



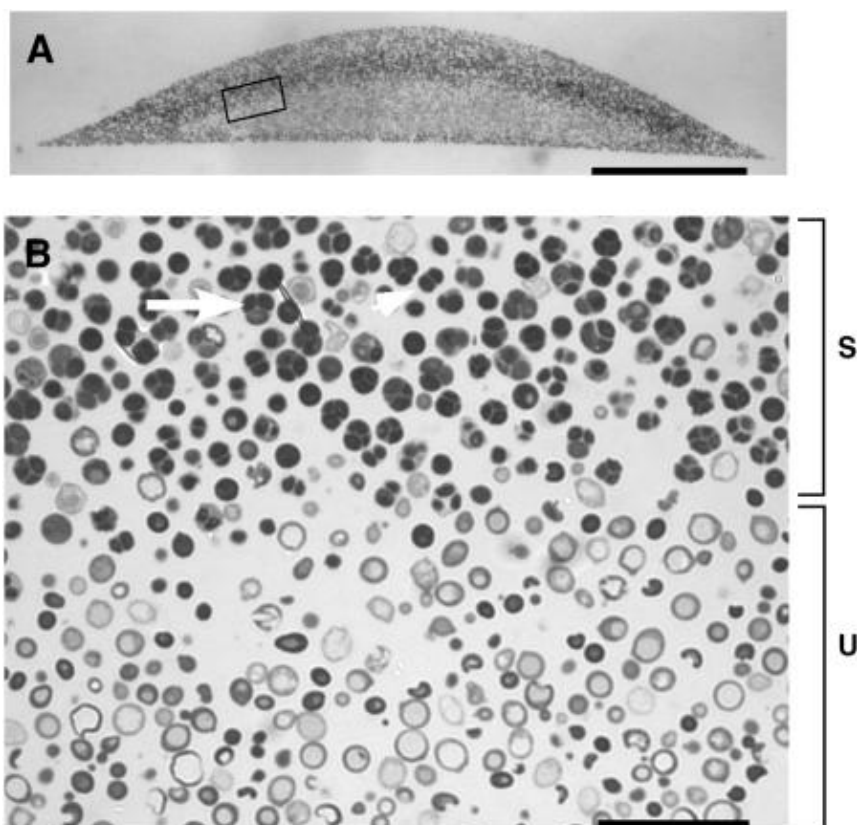
Obr. 9 - Diferenciace a vývoj kolonie divokého kmene *S. cerevisiae* BR-F. A) Růst kolonie mezi prvním a třetím dnem růstu, buňky jsou vizualizované fluorescenčním barvivem ConA (nespecifické barvení buněčné stěny), nebo Hmg1p-GFP (rozlišení růstové fáze; silná fluorescence je ve stacionárních buňkách). B) Model umístění jednotlivých buněčných subpopulací v rámci rostoucí kolonie; červená a žlutá - nedělící se klidové buňky v pozdní a časnější fázi; modrá - mladé nedělící se buňky; zelená - dělící se buňky. Převzato z (VÁCHOVÁ, *et al.*, 2011).



Obr. 10 - Kolonie *S. cerevisiae* exprimující markerový gen *LacZ* vložený za promotory různých genů vykazuje různé vzorce exprese v kolonii. Převzato z (MINARIKOVÁ, *et al.*, 2001).

Podobně jako v analogickém experimentu provedeném u kolonií *E. coli* (viz níže), také v koloniích *S. cerevisiae* dochází k rozdílné expresi některých genů v různých částech kolonie, jak ukázaly pokusy s expresí reportérového genu regulovaného promotorovou knihovnou (obr. 10) (MINARIKOVA, *et al.*, 2001).

Specifická lokalizace sporulujících buněk byla pozorována na řezech koloniemi *S. cerevisiae* rostoucími v poměrně hustém porostu (300 kolonií na Petriho misku) na acetátovém médiu po dlouhou dobu (8 dnů) (PICCIRILLO, *et al.*, 2010; PURNAPATRE a HONIGBERG, 2002). Na řezech kolonií je patrné, že kolonie je z hlediska přítomnosti sporulujících buněk rozdělená na dvě vrstvy, kde horní vrstva obsahuje vysoký podíl sporulujících buněk, zatímco dolní vrstva jich obsahuje jen malé procento (obr. 11).



Obr. 11 - Diferenciace na řezu 8 denní kolonie *S. cerevisiae*. A) Řez celou kolonií. B) Detail přechodu mezi horní vrstvou sporulujících buněk a spodní vrstvou nesporulujících buněk. Převzato z (PICCIRILLO, *et al.*, 2010).

Do horní vrstvy byla také lokalizována exprese fúzních konstruktů sporulačně specifických genů *IME1* a *IME2* s reportérovým genem. Jako důležitý faktor pro tuto diferenciaci se ukázalo být alkalické pH, které se v kolonii vytváří při prodloužené kultivaci na acetátovém médiu, pravděpodobně jako důsledek vylučování CO₂ během

respirace (OHKUNI, *et al.*, 1998). Navíc byla sporulace výrazně snížena v kmeni nesoucím delecí genu *RIM101* a *RIM13*, jejichž produkty se účastní signalizační dráhy odpovídající na vysoké extracelulární pH.

Dalším příkladem diferenciací v mnohobuněčné kvasinkové struktuře je stonkovitá struktura (stalk-like structure) tvořená *S. cerevisiae* za specifických podmínek při růstu na pevném médiu s vysokou koncentrací agaru (ENGELBERG, *et al.*, 1998). Agarové médium bylo namícháno tak, aby v něm bylo určité množství jamek. Na takto upravené médium byla nanášena souvislá vrstva inokula a médium bylo ozářeno UV zářením. Tím byly zabity všechny buňky na povrchu média, ale ty, ukryté v jamkách přežily, a jejich následným růstem se vytvořila stopkovitá struktura. U diploidního kmene tato struktura obsahovala značný podíl sporulujících buněk a proto je nasnadě spekulace, že tyto struktury slouží, podobně jako plodnice hlenek a myxobakterií, k šíření spor. Zdá se ale, že mechanismus tvorby je spíše čistě mechanický. Buňky jsou z jamky, kde začíná buněčný růst, postupně vytlačovány jak přirůstají nové a nové buňky, podobně jako je vytlačována zubní pasta z tuby. Mikroskopickou analýzou řezu touto strukturou se zjistila vnitřní diferenciací (SCHERZ, *et al.*, 2001). Vnitřek stonku je tvořen hustě k sobě naskládanými buňkami s minimem mezibuněčných prostor. Vnější vrstva je tvořena několika vrstvami buněk, které mezi sebou mají větší mezibuněčné prostory a při mikroskopické analýze se jeví jako mrtvé buňky nebo buňky podstupující programovanou buněčnou smrt. V celé struktuře bylo množství sporulujících buněk. Autoři se domnívají, že vrchní vrstva tvořená mrtvými buňkami může sloužit jako ochranná vrstva před nepříznivými podmínkami, která chrání buňky uvnitř struktury.

3.3 Heterogenita mikrobiálních společenství

3.3.1 Heterogenita v tekutých kulturách

Heterogenita mikrobiálních kultur je známá po velmi dlouhou dobu. Wilson (1922) si povšiml, že počty bakterií vyrostlých po výsevu na pevné médium neodpovídají počtu bakterií v původní kultuře pozorované mikroskopem. Usoudil, že část buněk v kultuře je dormantních. Kelly (1932) pozoroval jednotlivé kvasinkové buňky mikroskopem po nanesení na pevné médium a zjistil podstatné rozdíly v rychlosti buněčného dělení u jednotlivých buněk pocházejících ze stejné kultury. Další zajímavé pozorování se řadí

do doby krátce po objevení penicilinu. Po výsevu kultury *Staphylococcus* ošetřené penicilinem byl pozorován růst kolonií po výsevu na pevné médium (BIGGER, 1944). Kultury inokulované z těchto kolonií nicméně byly nadále citlivé k penicilinu. Nejednalo se tedy o dědičnou resistenci, ale spíše o fyziologický stav, ve kterém se část bakteriální populace nacházela v okamžiku působení antibiotika. Subpopulace buněk resistantních k antibiotiku byla nazvána persistentní buňky jako rozlišení od rezistentních buněk, jejichž resistance má trvalý charakter a její podklad je genetický (mutace nebo přenos DNA).

3.3.1.1 Persistentce

Nový zájem o persistentní buňky nastal v posledních letech, kdy se začal výzkum podrobněji věnovat problému antibiotikové resistance. Výskyt subpopulace persistentů byl popsán u *E. coli* (KEREN, *et al.*, 2004; MOYED a BRODERICK, 1986), *P. aeruginosa* (SPOERING a LEWIS, 2001) a také u kvasinky *C. albicans* (LAFLEUR, *et al.*, 2006). Persistenti jsou vlastně dormantní buňky, které mají zastavenou většinu buněčných funkcí (BALABAN, *et al.*, 2004). Z tohoto důvodu jsou mnohočetně resistantní k nejrozličnějším antibiotikům, jejichž mechanismus účinku je vždy blokáde nějaké buněčné funkce (nejčastěji translace nebo syntézy buněčné stěny). Jejich vznik v populaci je náhodný a frekvence jejich výskytu je závislá na kultivačních podmínkách. V exponenciálně rostoucích populacích je zpravidla velmi nízká (méně než 10^{-5}) a zvyšuje se v pomaleji rostoucích a stacionárních kulturách a biofilmech, kde může dosahovat až 1% všech buněk (KEREN, *et al.*, 2004). U *E. coli* byla identifikována hyperaktivní alela genu *hipA*, pojmenovaná *hipA7*. Kmen nesoucí tuto alelu vykazoval asi 1000 krát zvýšenou frekvenci výskytu persistentů (MOYED a BRODERICK, 1986). Delece genu *hipA* ale neměla žádný vliv na tvorbu persistentů. Opakované systematické pokusy identifikovat gen zodpovědný za tvorbu persistentů nebyly úspěšné (HANSEN, *et al.*, 2008; HU a COATES, 2005), což napovídá, že za vznik persistentů nenese odpovědnost jedna signální dráha, ale jde o komplexnější proces.

3.3.1.2 Sporulace a kanibalismus

Dalšími příklady heterogenity jsou sporulace a genetická kompetence u *B. subtilis*. Sporulace je u *B. subtilis* regulována hlavním regulačním proteinem Spo0A (DUBNAU a

LOSICK, 2006). Tento protein se exprimuje za podmínek hladovění, ale vždy jen u části populace. Ty buňky, které Spo0A exprimují, spustí vývojový program vedoucí k vytvoření extrémně odolných spor schopných přežít nepříznivé období a dát vznik nové populaci po přechodu do optimálních podmínek. Navíc se ukázalo, že buňky, které exprimují Spo0A, oddalují spuštění ireversibilního a energeticky náročného procesu sporulace tím, že exkretují do okolí toxin, kterému jsou sami odolné a který zabíjí buňky neexprimující *spo0A* (tj. ty, které nebudou sporulovat) (GONZALEZ-PASTOR, *et al.*, 2003). Z umírajících buněk citlivých k toxinu se uvolňují živiny, které jsou využívány sporulující populací pro vlastní přežití a uskutečnění sporulačního procesu. Tento fenomén se nazývá kanibalismus.

3.3.1.3 Kompetence

Genetická kompetence je stav, kdy jsou buňky schopné přijmout cizorodou DNA z okolí do buňky a inkorporovat ji do vlastního genomu. Tento proces se nazývá transformace a k jeho proběhnutí je zapotřebí exprese aparátu pro transport DNA do buňky a pro její rekombinaci. Kompetentní buňky přestávají růst a „doufají“, že získají nějakou výhodu inkorporací cizorodé DNA do genomu. U *B. subtilis* je hlavním regulátorem celého procesu gen *comK*, který je v kultuře ve stacionární fázi exprimován u asi 10% buněk (DUBNAU a LOSICK, 2006). Toto rozdělení není dáno genetickou heterogenitou populace, protože v případě kdy odebereme kompetentní i nekompetentní buňky a přemístíme je do čerstvého média, ve stacionární fázi bude v obou kulturách opět 10% kompetentních buněk (DUBNAU a LOSICK, 2006).

3.3.1.4 Další příklady

Opět u *B. subtilis* bylo pozorováno, že exponenciální populace je tvořena dvěma subpopulacemi výrazně odlišných buněk (KEARNS a LOSICK, 2005). Jedna subpopulace se skládá z jednotlivých buněk schopných pohybu, druhá populace je tvořena nepohyblivými řetízky buněk. Bližší studie ukázaly, že pohyblivé buňky exprimují alternativní σ -faktor σ^D , zatímco nepohyblivé buňky jej neexprimují. Dalším příkladem heterogenity bakteriální populace byl recentně popsán u *S. mutans*. V kulturách ve stacionární fázi tu dochází k vytvoření subpopulace buněk, které exprimují operon *pdh* nutný pro přežití období hladovění (BUSUIOC, *et al.*, 2010). Tato subpopulace tvoří asi

jen 1% z celkové populace.

Všechny popsané případy představují heterogenitu, nebo řekněme diferenciaci, která vzniká v tekuté třepané kultuře, kde jsou všechny buňky vystaveny stejnému prostředí. S rozvojem technik umožňujících analýzu jednotlivých buněk (např. single-cell PCR, průtoková cytometrie, mikrofluidní čipy, spektroskopické techniky s velkým rozlišením) bylo objeveno množství nejrozumnějších vlastností, v nichž vykazují mikrobiální populace heterogenitu (BOOTH, 2002; ELOWITZ, *et al.*, 2002; HERMELINK, *et al.*, 2009; KONOPKA, *et al.*, 2011; KUSSELL a LEIBLER, 2005; MCCOOL, *et al.*, 2004; STROVAS a LIDSTROM, 2009; SUMNER, *et al.*, 2003; TANIGUCHI, *et al.*, 2010; VEENING, *et al.*, 2008). Fenotypická heterogenita nebo plasticita (tyto termíny se používají pro heterogenitu v isogenních populacích, kde heterogenita není dána rozdíly v genomu) se tedy zdá být univerzální vlastností mikrobiálních společenstev. Heterogenita má pro populaci jako celek nesporné výhody, protože zvyšuje pravděpodobnost, že určitá subpopulace přežije nepříznivé podmínky a zajistí tak přežití populace jako celku. Už toto tvrzení poukazuje na určité mnohobuněčné chování mikrobiální populace, kdy není nejdůležitější přežití jednotlivé buňky, ale přežití jedince, v tomto případě populace. Z genetického hlediska není rozdíl mezi jednotlivými buňkami populace, protože mají shodný genom (předpokládá se, že mikrobiální populace v přírodě vznikají z jedné nebo několika geneticky blízkých buněk a tudíž jsou isogenní) a proto není důležité, které konkrétní buňky z populace dají vznik nové populaci.

3.3.2 Příčiny heterogenity

Jaké jsou ale příčiny této heterogenity? Jde o problém do jisté míry analogický k problému vývoje embrya z vajíčka a diferenciaci původně stejných buněk na odlišné. Mnoho pozornosti bylo v této souvislosti věnováno v poslední době faktoru stochasticity (náhodnosti) neboli šumu v genové expresi. Byly pozorovány dva druhy šumu: vnější a vnitřní (AVERY, 2006; KEARNS a LOSICK, 2005; SWAIN, *et al.*, 2002). Vnější šum je pozorován jako rozdíl v expresi reportérového genu mezi jednotlivými buňkami v populaci, zatímco vnitřní šum je definován jako rozdíl v expresi dvou shodných alel v jedné buňce.

3.3.2.1 Transkripční šum

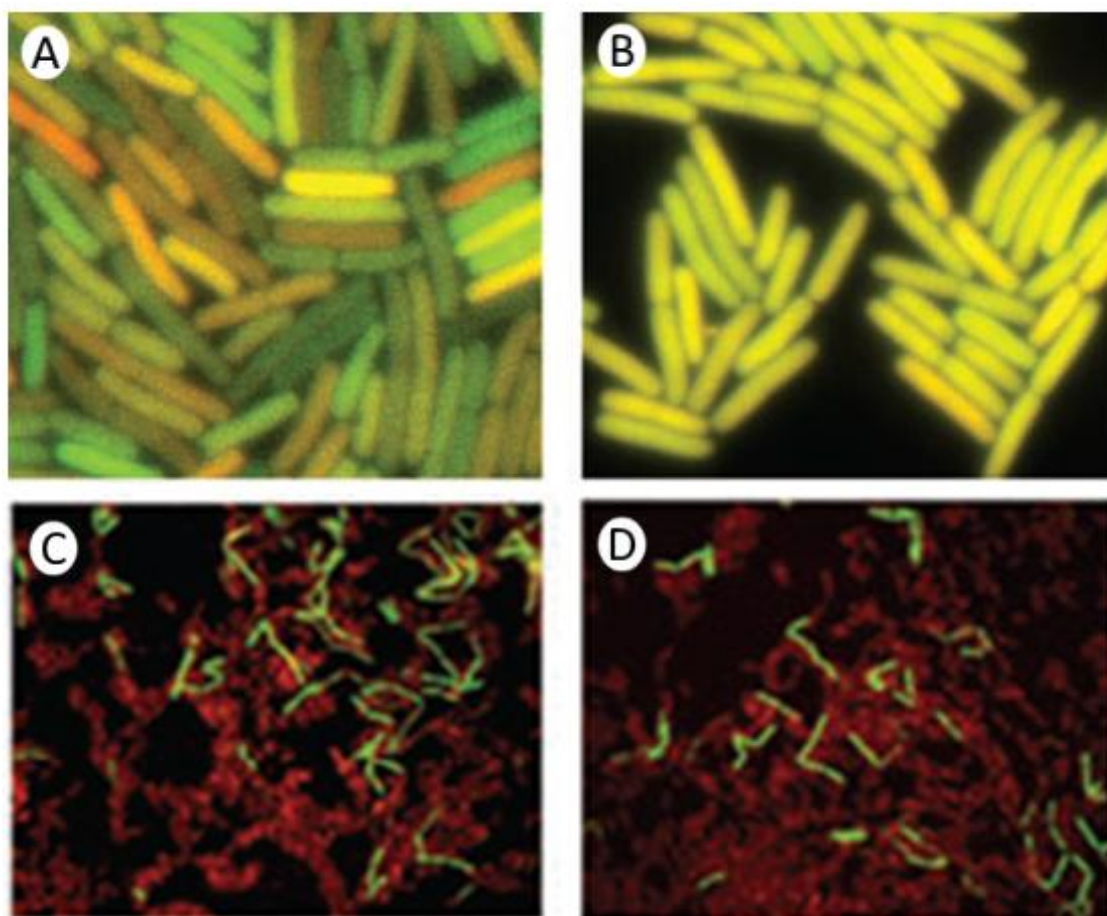
Ke sledování vnitřního šumu byl použit diploidní kmen *S. cerevisiae* exprimujících dvě různé barevné varianty zeleného fluorescenčního proteinu (GFP); žlutá varianta (yellow fluorescent protein, YFP) a modrozelená varianta (cyan fluorescent protein, CFP) vložené pod kontrolou stejného promotoru do stejného místa dvou homologních chromosomů. V tomto experimentálním systému byla pozorována nejen heterogenita v expresi fluorescenčního proteinu mezi jednotlivými buňkami, ale i rozdílná exprese obou fluorescenčních reportérových genů v individuálních buňkách (tj. poměr fluorescence YFP/CFP se měnil mezi jednotlivými buňkami) (RASER a O'SHEA, 2004). Podobný dvoureportérový systém byl zkonstruován i u *E. coli* (obr. 12) (ELOWITZ, *et al.*, 2002). Předpokládá se, že zdrojem vnitřního šumu je náhodnost při procesech obsazení promotoru transkripčními faktory, úspěšná aktivace transkripce z tohoto promotoru, iniciace translace a její úspěšnost z individuálních molekul mRNA a také rozdílnost v rychlosti jejich rozkladu (KEARNS a LOSICK, 2005). Počet událostí těchto jednotlivých procesů je omezený a v některých případech může být poměrně malý (transkripčních faktorů může být jen několik molekul na buňku, stejně jako kopií mRNA málo exprimovaného genu) a proto i náchylný k jednotlivým náhodným událostem. Podle tohoto předpokladu by měl vnitřní šum klesat se silou exprese genu. To bylo skutečně pozorováno u *S. cerevisiae*, kde byl šum promotoru genu *PHO5* regulovaného přítomností fosfátu, závislý na množství fosfátu v médiu a tedy na síle exprese genu *PHO5* (RASER a O'SHEA, 2004).

3.3.2.2 Bistabilita

Vnější šum, který zřejmě stojí za většinou pozorované mikrobiální fenotypové heterogenity, v sobě zahrnuje vnitřní šum (tzn. je ovlivňován stejnými mechanismy jako vnitřní šum) a navíc dalšími faktory, především vlastnostmi regulačních okruhů, které ovlivňují expresi sledovaného genu. Některé regulační dráhy vykazují znaky bistability. Takové signální dráhy se mohou nacházet ve dvou stabilních stavech: „vypnuto“ a „zapnuto“; přičemž to, jestli nastane jeden nebo druhý stav, je převážně dílem náhody. Vznik bistability drah podporuje regulace s pozitivní zpětnou vazbou, tj. taková regulace, kdy aktivita dané dráhy posiluje aktivaci sebe samé. Slabý aktivační signál nebo náhodná aktivace několika signalizačních molekul může díky tomuto efektu vést až k silné aktivaci dané dráhy a přechodu ze stavu „vypnuto“ do stavu „zapnuto“.

Podobné chování vykazují i dráhy obsahující dvojitou negativně-zpětnovazebnou smyčku (FERRELL, 2002).

Mnoho z příkladů heterogenity popsaných výše je typu vypnuto/zapnuto (sporulace, kompetence, persistence), to znamená, že buňka musí provést nějaké rozhodnutí, na jehož základě dojde ke změně fenotypu nebo diferenciaci. Populace se pak rozdělí na dvě subpopulace výrazně rozdílného fenotypu, tzv. dvoupopulační model (MCCOOL, *et al.*, 2004). Vlastnost, která nabývá pouze dvou výrazně odlišných stavů, se nazývá binární fenotyp (sporulující versus nesporelující buňky, kompetentní versus nekompetentní atd.).



Obr. 12 - Stochasticita v genové expresi a heterogenita populací. A), B) Heterogenita v expresi CFP a YFP pod kontrolou stejného promotoru regulovaného laktosou v populaci *E. coli*. A) kultivace v médiu bez laktosy, aktivita promotoru je nízká a šum je vysoký. B) Kultivace v médiu s IPTG, které indukuje promotory fluorescenčních proteinů. Převzato z (ELOWITZ, *et al.*, 2002). C), D) Syntéza exopolysacharidu extracelulární matrix subpopulací buněk v biofilmu *B. subtilis*. C) GFP pod kontrolou promotoru P_{eps} , který kontroluje operon *eps* účastníci se syntézy extracelulární matrix, červená fluorescence barviva FM4-64 vizualizuje všechny přítomné buňky. D) GFP pod kontrolou promotoru P_{yqxM} , který kontroluje operon *yqxM* účastníci se syntézy extracelulární matrix. Převzato z (CHAI, *et al.*, 2008).

3.3.3 Heterogenita v koloniích a biofilmech

Jedním z prvních pozorování heterogenity mikrobiálních mnohobuněčných společenství bylo sledování rozdílné exprese některých genů v rámci kolonie bakterie *E. coli* a *P. putida*. Byla vytvořena knihovna kmenů nesoucích reportérový gen *LacZ* náhodně vložený do různých míst genomu pomocí vektoru odvozeného od bakteriofága Mu (SHAPIRO, 1984). Bylo izolováno několik klonů, které vykazovaly heterogenní expresi v rámci kolonie. Nejčastější pozorované vzory byly: zabarvení středu kolonie nebo koncentrické kruhy a sektorová exprese, která je evidentně důsledkem klonální změny exprese. Jedním z rozdílně exprimovaných genů identifikovaných v následných studiích je gen *polA* kódující DNA polymerasu I (SHAPIRO, 1992). Podobné vzorce regulované exprese byly pozorovány v obdobných experimentech provedených na koloniích *B. subtilis* (SALHI a MENDELSON, 1993).

Heterogenita populace v koloniích byla prokázána i metodou FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) mikrospektroskopie, která je schopná rozlišit buňky různého složení (buňky různého druhu nebo buňky v různém fyziologickém stavu) na základě charakteristických infračervených spekter. Ngo Thi a Naumann (2007) zkoumali pomocí této metody kolonie *Legionella bozemanii*, *Bacillus megaterium* a *C. albicans*. Kolonie byly ve všech případech diferencované na vrstvy, z nichž měla každá typické spektrum značící rozdílný fyziologický stav (molekulové složení) buněk v jednotlivých částech kolonie. Podobné výsledky byly získány již dříve Ramanovou mikrospektroskopií, FTIR spektroskopií a měřením autofluorescence na velmi mladých (méně než 24 hod) koloniích *S. aureus*, *E. coli* a *C. albicans* (CHOO-SMITH, *et al.*, 2001). Heterogenita populací v biofilmu z hlediska produkce extracelulární matrix a exkretovaných proteáz byla pozorována v biofilmu *B. subtilis* (obr. 12) (CHAI, *et al.*, 2008). Produkce extracelulární matrix je tak překvapivě zajišťovaná jen malou subpopulací buněk specializujících se na tuto činnost. Toto chování se dá jistě charakterizovat jako altruistické, protože produkce matrix představuje nemalou zátěž pro producentské buňky.

3.3.4 Příčiny heterogenity v biofilmech a koloniích

3.3.4.1 Vytváření gradientů a difúze v biofilmech

Kromě výše zmíněných mechanismů podílejících se na vzniku heterogenity v tekutých kulturách další faktory specifické po tyto útvary. Především je to tvorba různých gradientů, které se vytváří v koloniích a biofilmech a vůbec nejsou přítomny v homogenních třepaných kultivacích. Nejtypičtějším příkladem takového gradientu je pokles koncentrace kyslíku v hlubších vrstvách biofilmu, který byl popsán mnohými autory (ALLEWALT, *et al.*, 2006; DE BEER, *et al.*, 1994; XU, *et al.*, 1998). Koncentrace kyslíku postupně klesá s hloubkou biofilmu. Je ale třeba zdůraznit, že tento jev není důsledkem nízké difúze nebo rozpustnosti kyslíku v extracelulárním prostředí, ale důsledkem aerobního metabolismu, který probíhá v horních vrstvách biofilmu a spotřebovává všechny kyslík, který přichází od povrchu biofilmu (STEWART a FRANKLIN, 2008) (STEWART, 2003). Do hlubších vrstev tak nemůže žádný kyslík pronikat.

Difúze prakticky jakékoli molekuly v rozměrech tloušťky biofilmu je otázkou minut, v horizontálním směru jsou vzdálenosti pochopitelně větší a i difuze probíhá o něco pomaleji. Molekuly, které se nemetabolizují, tedy gradienty nevytváří. Naprosto odlišná situace nastává, pokud se jedná o látky, které jsou metabolizovány alespoň některými buňkami populace. Rychlost metabolické spotřeby totiž bývá vyšší než rychlost difúze a proto se všechny molekuly, které přijdou do kontaktu s buňkami, které jsou schopné je zpracovat, metabolizují a do hlubších vrstev nepronikne nic. Vzniká tak strmý gradient této látky. Tento mechanismus pravděpodobně zapříčiňuje vysokou odolnost biofilmů k antibiotikům a dalším toxinům (STEWART, 2003).

V biofilmu se tedy vytváří gradienty metabolických substrátů jako je kyslík, glukosa a jiné živiny. Tyto gradienty jsou tvořeny od povrchu biofilmu, kde jsou buňky v kontaktu s živným médiem a kyslíkem. Naopak metabolické produkty, které jsou sekretovány buňkami, vytváří gradient o opačném sklonu. Nejvyšší koncentrace je v nejspodnějších vrstvách biofilmu. Může se jednat o odpadní produkty metabolismu, ale také signální molekuly nebo například extracelulární sekretované enzymy a siderofory. Složitější gradienty mohou být vytvořeny, pokud je biofilm diferenciován na vrstvy tvořené metabolicky různě aktivními buňkami, nebo se jedná o vícedruhový biofilm. Pak může nastat situace, kdy jeden typ buněk sekretuje nějaký metabolický intermediát

nebo odpadní produkt, který je následně metabolizován jiným buněčným typem nebo druhem v jiné vrstvě biofilmu. Taková molekula by pravděpodobně měla nejvyšší koncentraci na hranici oblasti, kde se produkuje, a oblasti, kde je spotřebovávána.

Kromě gradientu kyslíku byly v biofilmech zaznamenány gradienty pH, H₂O₂, amonných iontů, dusičnanů a dalších (LIU, *et al.*, 2011; OKABE, *et al.*, 1999; SCHRAMM, *et al.*, 1996).

Doposud jsme uvažovali biofilm jako útvar tvořený na pevném nepropustném substrátu omývaný médiem. U kolonií je situace trochu odlišná. Protože kolonie roste na pevném živném médiu, živiny zde difundují odspodu směrem nahoru. Kyslík pak difunduje stejně jako v biofilmech shora dolů.

Jestliže existují v biofilmech gradienty různých látek, každé místo v biofilmu je do určité míry unikátní kombinací koncentrací různých živin, signálních molekul a odpadních produktů. Buňky tyto koncentrace dokáží detekovat a reagovat na ně přizpůsobením svojí fyziologie. Tento mechanismus může vést k rozrůznění buněk a následně k diferenciaci mnohobuněčné struktury.

3.3.5 Genetická variabilita a stochasticita genové exprese v biofilmech

Buňky v biofilmech jsou neobyčejně heterogenní. Po několikadenním růstu biofilmu často dochází k objevování se různých variant lišících se morfologií kolonií po následném výsevu (ALLEGRUCCI a SAUER, 2007; KIRISITS, *et al.*, 2005; MCELLISTREM, *et al.*, 2007). Podobně byla popsána heterogenita v produkci extracelulární matrix a resistance vůči antibiotikům. V mnoha případech se ukázalo, že heterogenita je podmíněná geneticky, tedy vznikem nějaké mutace, nebo genomové přestavby. Je zajímavé, že podobná variabilita nebyla zaznamenána v planktonních kultivacích. Mechanismy vzniku genetické variability budou popsány v následující kapitole.

Také stochasticita v genové expresi nepochybně přispívá k fyziologické heterogenitě biofilmů. Některé bistabilní regulační dráhy mohou být zcela náhodně zapnuty, nebo vypnuty nezávisle na okolním prostředí, jak je popsáno výše. V biofilmech byly zaznamenány rozdílné intenzity exprese reportérových proteinů v buňkách těsně spolu sousedících, které se jen těžko dají vysvětlit rozdílným chemickým složením okolí. Například exprese genu *chiA* pro chitinasu označeného zeleným fluorescenčním proteinem v biofilmu *P. aeruginosa* byla často výrazně odlišná ve dvou sousedících

buňkách (BATY, *et al.*, 2000). Podobně je náhodně regulována produkce extracelulární matrix u *B. subtilis* (obr. 12) (CHAI, *et al.*, 2008).

Příčinou heterogenity buněčných populací v biofilmech jsou tedy:

- gradienty živin a jiných látek, které vytváří v různých místech biofilmu různé podmínky, na které buňky v těchto místech reagují a jímž se přizpůsobují
- genetická variabilita vzniklá jako důsledek indukované mutagenese (viz níže) a selekce v podmínkách biofilmu
- náhodné přepínání některých bistabilních regulačních drah vedoucích k rozdílům v genové expresi.

3.3.5.1 Vznik genetické variability

Genetická variabilita v biofilmu byla pozorována u mnoha bakteriálních druhů. Protože variabilita populace rozšiřuje rozsah podmínek, za kterých se najde alespoň část buněk schopná přežít, je zvýšení variability jistě přínosem pro schopnost přežití populace jako celku. Genetická variabilita indukovaná v biofilmu by proto mohla představovat jakousi pojistku pro případ náhlé změny podmínek nebo přítomnost antimikrobiálních látek (BOLES, *et al.*, 2004).

Mechanismus vzniku genetických variant byl v některých případech podrobněji popsán. U *P. aeruginosa* je vznik variant závislý na endogenním oxidativním stresu, který produkuje zlomy v genomové DNA, což má za následek aktivaci opravného systému zajišťovaného proteinem RecA. Přidání antioxidantu nebo delece *recA* vede ke snížení genetické variability (BOLES, *et al.*, 2004). U *S. pneumoniae* byl dokonce identifikován gen *spxB* nutný jak pro produkci H₂O₂, tak pro vznik genetických variant. Jedná se o gen pro pyruvát oxidasu, která produkuje z pyruvátu peroxid vodíku. Tento peroxid vodíku má za následek zvýšenou úmrtnost ve spodních vrstvách biofilmu a také genetickou variabilitu díky oxidativně indukované mutagenesi (REGEV-YOCHAY, *et al.*, 2007).

3.3.6 Diferenciace v tekuté kultuře *S. cerevisiae*

Mikrobiální tekuté kultivace mají typickou růstovou křivku, na které je exponenciální fáze růstu následována stacionární fází, kde se hustota populace nezvyšuje, a postupem času i snižuje. Tekuté kultury *S. cerevisiae* ve stacionární fázi byly podrobeny bližšímu

zkoumání ve snaze zjistit, jestli je stacionární kultura tvořena homogenní populací buněk, nebo zde dochází k nějaké formě diferenciaci na subpopulace. Bylo zjištěno, že ze stacionárních kultur je možné centrifugací v gradientu Percollu izolovat dvě subpopulace buněk lišících se svou vznášivou hustotou (ALLEN, *et al.*, 2006). Diferenciace populace byla patrná až u kultur starých několik dní, u mladších kultur nebylo možné tyto subpopulace oddělit.

Buňky s vyšší hustotou (v Percollovém gradientu tvořily pás s vyšší hustotou blíže ke dnu centrifugační zkumavky a proto byly nazvány spodní frakcí) měly na elektronmikroskopickém řezu patrné pouze jádro a vakuolu, ostatní organely na snímcích vidět nebylo. Buňky také obsahovaly více glykogenu. Buňky s nižší hustotou (horní frakce) měly velkou vakuolu a větší počet mitochondrií. Obsah glykogenu byl nízký.

Kromě toho vykazovaly obě subpopulace také rozdíly v mnoha fyziologických parametrech (ALLEN, *et al.*, 2006). Buňky spodní frakce měly vyšší životaschopnost měřenou jako počet CFU i pomocí fluorescenčního barviva FUN-1 specificky barvícího metabolicky aktivní buňky a také vyšší odolnost k teplotnímu šoku. Tyto znaky jsou spolu s akumulací glykogenu typické pro buňky z kultur ve stacionární fázi, a proto byly buňky spodní frakce nazvány klidové („quiescent“). Pro rozlišení pak byly buňky horní frakce nazvány neklidové („non-quiescent“). Studium počtu jizev se ukázalo, že klidové buňky jsou replikativně velmi mladé a přes 90% jich nemá žádnou jizvu (jsou tedy panny). Naproti tomu buňky spodní frakce jsou replikativně starší (13% z nich má více než 3 jizvy). V neklidových buňkách také byl detekován větší výskyt znaků apoptosy nebo apoptose podobné buněčné smrti, jak byla popsána u kvasinek (zvýšená produkce ROS, barvení Annexinem V, výskyt dvouřetězcových zlomů na DNA) (MADEO, *et al.*, 1999).

Autoři také navrhli model vzniku dvou populací v homogenním prostředí třepané kultury, podle něž buňky vzniklé po vyčerpání zdroje živin jsou přizpůsobené na přežití v podmínkách s nízkou koncentrací živin, nedělí se a stanou se z nich klidové buňky (ALLEN, *et al.*, 2006). Replikativně starší buňky, jež tvořily kulturu ještě před vyčerpáním živin, se novým podmínkám nedokáží plně přizpůsobit a postupně odumírají. Poskytují tak živiny pro populaci klidových buněk. Podobné morfologicky a fyziologicky rozdílné frakce byly izolovány také při dlouhodobé kultivaci za podmínek průmyslové produkce ethanolu (BENBADIS, *et al.*, 2009).

4 Seznam použitých metod

Základní mikrobiologické metody

PCR

Elektroforéza

Transformace *S. cerevisiae*

Měření uvolňování amoniaku z kolonií

Fluorescenční barvení

Mikroskopie fluorescenční a světelná

Měření fluorescence spektrofotometrem

Stanovení buněčných populací průtokovým cytometrem

Kapkové testy

Frakcionace buněk na sacharosovém gradientu

Isolace celkové buněčné RNA

Northern blot

Densitometrické vyhodnocení Northern blotů

Isolace mRNA

Stanovování transkriptomových rozdílů metodou microarrays

Vyhodnocení dat z microarrays

5 Výsledky

5.1 Publikace I

Yeast Colony Survival Depends on Metabolic Adaptation and Cell Differentiation Rather Than on Stress Defense

Michal Čáp, Libuše Váchová a Zdena Palková

Journal of Biological Chemistry (2009) November 20; 284(47): 32572–32581.

IF=5,328

V tomto článku jsme se zaměřili na vliv genů ochrany před oxidativním stresem na vývoj a horizontální diferenciaci kvasinkových kolonií. Z předchozích výsledků bylo známo, že apoptotické znaky, ale také exprese některých metabolických genů, se liší v rámci kolonie rodičovského kmene ve středu a na okraji kolonie (viz Literární úvod). Tato diferenciaci je výrazně snížena v kmeni *sok2Δ*, který není schopen produkce amoniaku. Během vývoje kolonie se se vstupem do alkalické fáze růstu indukují enzymy alternativního metabolismu a zároveň se, trochu překvapivě, snižuje aktivita enzymů zajišťujících antioxidantní ochranu. Proto nás zajímalo, jakou mají tyto mechanismy úlohu ve vývoji kolonie. Pro toto studium jsem použil deleční mutanty v klíčových genech antioxidantní ochrany *SOD1*, *SOD2* a *CTT1* a sledoval diferenciaci, metabolické a stresové markery v koloniích tvořených těmito kmeny. Kmen *sod1Δ* s delecí v cytosolické superoxid dismutase připomínal ve studovaných faktorech (tj. produkce amoniaku, diferenciaci a spuštění alternativního metabolismu) kolonie rodičovského kmene. Naproti tomu kolonie kmene *sod2Δ* a do menší míry také *ctt1Δ* měly výrazně sníženou produkci amoniaku a s tím spojenou alkalizaci média a zároveň slaběji indukovaly alternativní metabolismus a také zde byla snížena diferenciaci. Z výsledků vyplývá, že diferenciaci a přežití kolonie závisí na vstupu do alkalické fáze růstu spojené s produkcí amoniaku a metabolickými změnami v kolonii a nezávisí tolik na stresové ochraně, jak je tomu u tekutých kultur.

Yeast Colony Survival Depends on Metabolic Adaptation and Cell Differentiation Rather Than on Stress Defense^{*[5]}

Received for publication, May 19, 2009, and in revised form, September 16, 2009. Published, JBC Papers in Press, September 28, 2009, DOI 10.1074/jbc.M109.022871

Michal Čáp[‡], Libuše Váchová^{‡§}, and Zdena Palková^{‡1}

From the [‡]Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Sciences, Charles University in Prague, Viničná 5, 128 44 Prague 2 and the [§]Institute of Microbiology AS CR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

Enzymes scavenging reactive oxygen species (ROS) are important for cell protection during stress and aging. A deficiency in these enzymes leads to ROS imbalance, causing various disorders in many organisms, including yeast. In contrast to liquid cultures, where fitness of the yeast population depends on its ROS scavenging capability, the present study suggests that *Saccharomyces cerevisiae* cells growing in colonies capable of ammonia signaling use a broader protective strategy. Instead of maintaining high levels of antioxidant enzymes for ROS detoxification, colonies activate an alternative metabolism that prevents ROS production. Colonies of the strain deficient in cytosolic superoxide dismutase Sod1p thus developed the same way as wild type colonies. They produced comparable levels of ammonia and underwent similar developmental changes (expression of genes of alternative metabolism and center margin differentiation in ROS production, cell death occurrence, and activities of stress defense enzymes) and did not accumulate stress-resistant suppressants. An absence of cytosolic catalase Ctt1p, however, brought colonies developmental problems, which were even more prominent in the absence of mitochondrial Sod2p. *sod2Δ* and *ctt1Δ* colonies failed in ammonia production and sufficient activation of the alternative metabolism and were incapable of center margin differentiation, but they did not increase ROS levels. These new data indicate that colony disorders are not accompanied by ROS burst but could be a consequence of metabolic defects, which, however, could be elicited by imbalance in ROS produced in early developmental phases. Sod2p and homeostasis of ROS may participate in regulatory events leading to ammonia signaling.

When organisms, including yeast, grow under aerobic conditions, they produce ROS² as a consequence of aerobic respiration. Their excess is scavenged by different stress defense enzymes. Various clinical human disorders such as porphyria,

hypertension, atherosclerosis, and some neurodegenerative diseases are believed to be partly induced by unbalanced ROS levels or by a deficiency in one of the stress defense enzymes (1).

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* can protect itself against various stresses (including oxidative stress) with a variety of ROS-scavenging enzymes, including superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidases, peroxiredoxins, and others. As do other eukaryotes, *S. cerevisiae* contains cytosolic CuZn-Sod1p and mitochondrial Mn-Sod2p superoxide dismutases responsible for the removal of superoxide radicals. Another *S. cerevisiae* enzyme that plays a role in ROS detoxification and yeast resistance to various stresses (2, 3) and that appears to be important for replicative life span (4) and programmed cell death (5) is the cytosolic catalase Ctt1p, which decomposes hydrogen peroxide.

Mutants deficient in mitochondrial Sod2p are sensitive to hyperoxia and exhibit growth inhibition on respiratory carbon sources, but during aerobic growth on glucose the absence of this enzyme has little effect (6). The loss of Sod1p leads to more pleiotropic defects, including sensitivity to various exogenous stresses and reduced growth under all aerobic conditions because of oxidative injury by internal oxygen species (7–9). A consequence of endogenous oxidative stress is damage of particular biosynthetic enzymes, resulting in lysine and methionine auxotrophy (10). Defective phenotypes associated with *sod1Δ* strains are usually suppressed by the accumulation of stress-resistant mutants of the two main groups. The first group includes mutations in the *BSD1* and *BSD2* genes involved in Mn²⁺ homeostasis (11). The *sod1Δbsd* mutants increase the cytosolic concentration of Mn²⁺, which possesses some intrinsic superoxide dismutase activity and partially compensates for the absence of Sod1p. The second group, designated *seo* (for suppressors of endogenous oxygen toxicity), includes various mutations that restore Met and Lys prototrophy, although sensitivity to environmental oxidants (e.g. Paraquat) is not reverted (10).

In contrast to liquid microbial cultures commonly studied in laboratories, microorganisms in their natural environments often organize as multicellular communities (e.g. colonies and biofilms) with unique properties (12, 13). During long term development, colonies of different yeasts can undergo developmental changes characterized by extracellular alkalization and production of volatile ammonia, which functions as a signaling molecule (14). In *S. cerevisiae* colonies, ammonia elicits expression changes leading to metabolic reprogramming (e.g. activation of peroxisomes and fatty acid β -oxidation, the methyl glyoxylate cycle, amino acid metabolism, and the production of

* This work was supported by Grant Agency of the Czech Republic Grants 525/05/0297 and 204/08/0718; by Ministry of Education Grants LC531, MSM0021620858, and AV0Z50200510; and by Howard Hughes Medical Institute International Research Award 55005623 (to Z. P.).

[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1–S7.

¹ To whom correspondence should be addressed: Dept. of Genetics and Microbiology, Charles University in Prague, Viničná 5, 128 44 Prague 2, Czech Republic. Tel.: 420-221-951-721; Fax: 420-221-951-724; E-mail: zdenap@natur.cuni.cz.

² The abbreviations used are: ROS, reactive oxygen species; DHE, dihydroethidium; GS, glutamine synthetase; Met⁺, methionine prototrophy; PQ^r, Paraquat-resistant; wt, wild type; MES, 4-morpholineethanesulfonic acid.

different plasma membrane transporters) and a parallel decrease in the expression of stress-related genes (including *CTT1* and *SOD1*) and genes of mitochondrial oxidative phosphorylation (15). Ammonia signaling is also important for constraining apoptotic-like cells to the colony center (16).

This study assesses the importance of the individual stress defense enzymes (a deficiency of which poses a serious problem for liquid yeast cultures) during the development of *S. cerevisiae* colonies. New data suggest that in colonies activation of the ammonia-induced adaptive metabolism is more important for proper development and survival than the presence of ROS scavenging enzymatic activities. Nevertheless, ROS homeostasis appears to be important for the induction of ammonia signaling and activation of metabolic changes.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Strains and Media—*S. cerevisiae* strain BY4742 (MAT α , *his3* Δ , *leu2* Δ , *lys2* Δ , *ura3* Δ) and all isogenic mutants (*sod1* Δ , *sod2* Δ , *ctt1* Δ) were obtained from the EUROSCARF collection. Yeast giant colonies (14) were grown 6/plate at 28 °C on GMA (1% yeast extract, 3% glycerol, 2% agar, 30 mM CaCl₂) or on GMA-bromocresol purple (GMA, 0.01% bromocresol purple). Liquid yeast cultures were grown at 28 °C in a shaker in either YPD (2% glucose, 1% yeast extract, 1% pepton), GM (GMA without agar), or SD (2% glucose, 100 mM KH₂PO₄, 15 mM (NH₄)₂SO₄, 0.8 mM MgSO₄, 0.15% Wickerham's yeast nitrogen base supplemented with 150 mg/liter of histidine, leucine, lysine, and methionine and 60 mg/liter of uracil), buffered with 50 mM potassium P_i (KH₂PO₄/K₂HPO₄), pH 6.5, when appropriate. Agar media (YPD and SDA) were solidified with 2% agar. Gene, protein, and mutant strain symbols follow standard yeast terminology.

Measurement of Ammonia Production—Ammonia released by growing colonies was absorbed into acidic traps (14). The amount of ammonia was determined using Nessler's reagent.

Determination of Catalase and Superoxide Dismutase Activity—The methods used were described previously (17). In brief, cells from the central and margin regions of 6–12 colonies were broken in 10 mM MES buffer, pH 6, with Complete, EDTA-free protease inhibitor mixture (Roche Applied Science) and 1 mM 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (Sigma) with glass beads in a FastPrep instrument (QBiogene). After cell debris removal, the supernatant (5–15 μ g of proteins/slot determined using a Bio-Rad protein detection kit) was subjected to PAGE under nondenaturing conditions. Superoxide dismutase and catalase activity in the gels was determined (18, 19). Enzyme activities were quantified by image analyses using UltraQuant 6.0 software (Media Cybernetics).

RNA Isolation and Northern Blot Analysis—Total RNA from ~100 mg of wet colony biomass was extracted by a hot phenol method (15). For northern blots, 15 μ g of total RNA was separated in 1.5% agarose gel and transferred to a positively charged nylon membrane (Amersham Biosciences). The Northern blots were densitometrically quantified using UltraQuant 6.0 software. The values presented are relative densities calculated for the maximal value of each film (set as 100%). *RDN18* was the nonregulated control gene.

Analysis of Cell Survival and Presence of Suppressor Mutants in Liquid Media—Survival of cells from colonies was analyzed in liquid SD, YPD, or GM (inoculated to A₅₆₀ = 0.2). The number of living cells was determined after 1–7 days of cultivation by drop assay. Five-microliter drops of serial 10-fold dilutions of the cell cultures were spotted on an YPDA, and the number of colony-forming cells was determined after 3 days of cultivation. The appearance of suppressor mutants in *sod1* Δ cultures was determined by drop assay on SDA without methionine and on YPDA supplemented with 1.5 mM Paraquat (methyl viologen; MP Biomedicals) or 5 mM MnSO₄.

Heat Shock Tolerance—Harvested colonies were suspended in distilled water to a concentration of 7.5 mg/ml. 10-fold serial dilutions of these suspensions were incubated at 52 °C for 150 min in microtitre plates, and then 5 μ l drops were spotted on YPDA. The number of colony-forming cells was determined after 3 days of cultivation. Control cells were spotted at the same dilutions before the heat treatment.

Detection of Dying Cells—For 4',6'-diamidino-2-phenylindole staining of the DNA, the cells were permeabilized with 60% ethanol. 4',6'-Diamidino-2-phenylindole was added to a final concentration of 2.5 μ g/ml, and the cells were observed under a fluorescence microscope using an A filter (Leica). Nuclear morphology was determined from a minimum of 500 cells/sample. Cell morphology and the presence of shrunken cells were visualized with Nomarski contrast (supplemental Fig. S3A).

ROS Quantification—For DHE staining, 50 μ l of 15 mg/ml cell suspension in 25 mM MES, pH 6, was incubated with 5 μ l of 25 μ g/ml DHE (Sigma; 1 mg/ml stock solution in Me₂SO) for 25 min. The suspension was then transferred to a cuvette with 1.95 ml of distilled water. Mitochondrial superoxide production was monitored by MitoSOX Red staining. Twenty-five μ l of 0.5 mM MitoSOX (Molecular Probes; 5 mM stock solution in Me₂SO) was added to a cuvette with 2 ml of cell suspension (containing 0.75 mg of wet biomass) and incubated for 5 min. The release of hydrogen peroxide from cells was measured with an Amplex Red horseradish peroxidase kit (Molecular Probes). Fifty μ l of cell suspension (15 mg/ml in 25 mM MES buffer, pH 6.0) incubated for 30 min in the presence of 50 μ M Amplex Red, and 5 units/ml of horseradish peroxidase was diluted with 1.95 ml of distilled water. Fluorescence was measured using a FluoroMax 3 spectrofluorometer (Jobin Yvon) with the following excitation/emission wavelengths: 480/604 nm for DHE, 510/580 nm for MitoSOX Red, and 525/585 nm for Amplex Red. Readings from unstained cells were used as an autofluorescence control and subtracted from the stained cell fluorescence.

Glutathione Peroxidase and Glutamine Synthetase Protection Assay—The enzymatic activities of glutathione peroxidase and peroxiredoxins were measured in cell extracts prepared as described above, with the exception of using 50 mM potassium P_i, pH 7.8, for the extraction. The samples of 100 μ g of protein were assayed with a glutathione peroxidase cellular activity assay kit (Sigma) detecting changes in NADPH absorbance after the addition of *tert*-butyl hydroperoxide. Peroxiredoxin activity was assayed by glutamine synthetase (GS) protection assay (20, 21), which is based on the sensitivity of GS to oxidative damage caused by a thiol/Fe³⁺/O₂ mixed function oxidase system. The ability of a cell extract to protect GS from oxidative

How to Survive within Yeast Colonies

damage is mostly ascribed to the activity of peroxiredoxins (21). In the assay, 1 unit of glutamine synthetase (Sigma) in 50 μ l was incubated with a mixture of 3 μ M FeCl₃ and 10 mM dithiothreitol in the presence of the cell extract (containing 50 μ g of protein). After 10 min, the remaining GS activity was determined by adding 950 μ l of a GS activity assay mixture (0.4 mM ADP, 150 mM glutamine, 10 mM KH₂AsO₄, 20 mM NH₂OH, 0.4 mM MnCl₂, 100 mM HEPES, pH 7.4). After 15 min, the reaction was stopped with 200 μ l of a mixture of 5.5% FeCl₃, 2% trichloroacetic acid, and 2% HCl. The γ -glutamylhydroxamate-Fe³⁺ complex was determined at 420 nm. The intrinsic GS activity of the cell extract was subtracted. The activity of GS prior to treatment with FeCl₃/dithiothreitol was taken as 100%. Without the protection by cell extract, the GS completely lost its activity.

Statistics—The data points representing the means \pm S.D. were calculated from at least four independent experiments. Where appropriate, data significance was determined using the two-tailed *t* test. *p* values of 0.05 or less were considered statistically significant: *, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01 or commented in the figure legends.

RESULTS

Deficiency in *Sod2p* but Not in Cytosolic *Sod1p* Causes Defects in Colony Development and Ammonia Signaling—The growth of colonies of strains deficient in Sod1p, Sod2p, or cytosolic Ctt1p on GMA was comparable with the growth of wild type (wt) BY4742 colonies (supplemental Fig. S1), exhibiting a linear increase in cell biomass that is typical for yeast colonies growing on solid media (16, 22). The colony development, however, substantially differed among strains, some being impaired in ammonia signaling. Whereas *sod1Δ* colonies exhibited a morphology, alkalization, and ammonia production comparable with the wt phenotype, *sod2Δ* colonies displayed altered morphology and failed to produce ammonia and accomplish transition to the alkali phase (Fig. 1, A and B). *ctt1Δ* colonies produced a reduced level of ammonia.

To find out whether *sod1Δ*, *sod2Δ*, and *ctt1Δ* colonies are able to activate adaptive metabolic changes ascribed to ammonia signaling (15), we monitored expression of the most relevant genes involved in these changes. Expression of carbon metabolism and transporter genes (*CIT3*, *POX1*, *ATO1*, *ATO3*, and *JEN1*) was activated in ammonia-producing *sod1Δ* colonies as well as in wt colonies. The expression of these genes reached significantly lower levels in *sod2Δ* colonies and was slightly diminished in *ctt1Δ* colonies (Fig. 1C and supplemental Fig. S2A). On the other hand, *sod2Δ* colonies maintained a partially higher level of stress-related gene expression (*MSN4*, *HSP30*, and *CTT1*), contrary to *sod1Δ* and wt colonies (Fig. 1D and supplemental Fig. S2B). These data showed that colonies of all three mutants initiated adaptive metabolic changes in approximately the same developmental period as did wt strain colonies, but in *sod2Δ* (and to some extent also in *ctt1Δ*) colonies the changes did not reach a level comparable with that of the wt and *sod1Δ* colonies.

Deficiency in Ammonia Signaling Correlates with the Absence of Cell Differentiation within *sod2Δ* and *ctt1Δ* Colonies—Because *sok2Δ* colonies lacking Sok2p transcription factor and defective in ammonia signaling also exhibit an altered distribu-

tion of dying apoptotic-like cells (16), we examined center margin colony differentiation in *sod1Δ*, *sod2Δ*, and *ctt1Δ* colonies. First, we analyzed the occurrence of cells exhibiting late dying features (chromatin condensation and fragmentation as well as the presence of “shrunk,” i.e. partially digested, cells) (Fig. 2A and supplemental Fig. S3A) in outer margin and central colony areas. As in wt colonies, the cells exhibiting modified nuclei and shrunk cells were preferentially localized to central regions in ammonia-producing *sod1Δ* colonies, whereas cells located at the margin were mostly normal and healthy. In contrast, the cells with both dying features were spread throughout the whole of *sod2Δ* and *ctt1Δ* colonies (impaired in ammonia production) (Fig. 2A) similarly as in *sok2Δ* colonies (16).

Furthermore, we determined stress-related characteristics of cells harvested from the central and margin regions of colonies from each strain. We determined ROS levels, ROS-scavenging enzyme activity, and cell tolerance to heat shock (Fig. 2, B–F). Cellular ROS production is characteristic of oxidative stress and has also been linked to ongoing apoptosis (23). The occurrence of the superoxide was detected as superoxide-mediated oxidation of either DHE (detecting total cellular superoxide) or MitoSOX Red, an indicator of mitochondrial superoxide. After entering the alkali phase (at day 11), central and outer cells in colonies of both ammonia-producing strains (wt and *sod1Δ*) exhibited divergent trends in both mitochondrial and cellular superoxide levels. Whereas superoxide concentration gradually increased in the colony center, we observed a simultaneous decrease in the colony margin. A significantly smaller center margin difference was observed in ammonia production-impaired *sod2Δ* and *ctt1Δ* colonies. Interestingly, however, despite the similar profiles in central and outer cells, relative levels of mitochondrial (Fig. 2C) and cellular (Fig. 2B) superoxide differed. Total cellular superoxide levels in central cells of *sod2Δ* and *ctt1Δ* colonies did not increase as in wt central cells, whereas outer cell levels were comparable with wt (Fig. 2B). Conversely, mitochondrial superoxide levels in outer cells of *sod2Δ* and *ctt1Δ* did not decrease as in their wt counterparts, whereas central cell levels remained equivalent (Fig. 2C). These data showed that the overall superoxide level did not increase in *sod1Δ*, *sod2Δ*, and *ctt1Δ* colonies in general, although homeostasis of mitochondrial and cellular superoxide was differentially misbalanced.

Cell production of hydrogen peroxide was determined through the Amplex Red assay (supplemental Fig. S4). The results confirmed that center margin H₂O₂ differences were nearly 40% more pronounced in wt and *sod1Δ* colonies as compared with *sod2Δ* and *ctt1Δ* colonies. However, the center margin difference in ammonia-producing colonies as compared with colonies defective in ammonia production was less prominent than in the case of the superoxide. This could be caused by more efficient diffusion of H₂O₂ across a colony. Overall amounts of H₂O₂ released by colonial cells were just 6–17% of the amounts released by 24-h-old wt cells cultivated in YPD liquid medium (data not shown).

Because the cellular ROS homeostasis is determined by both ROS production and ROS-scavenging enzymes, we examined catalase and superoxide dismutase activity in colonies. Within wt and *sod1Δ* colonies, Ctt1p activity was sig-

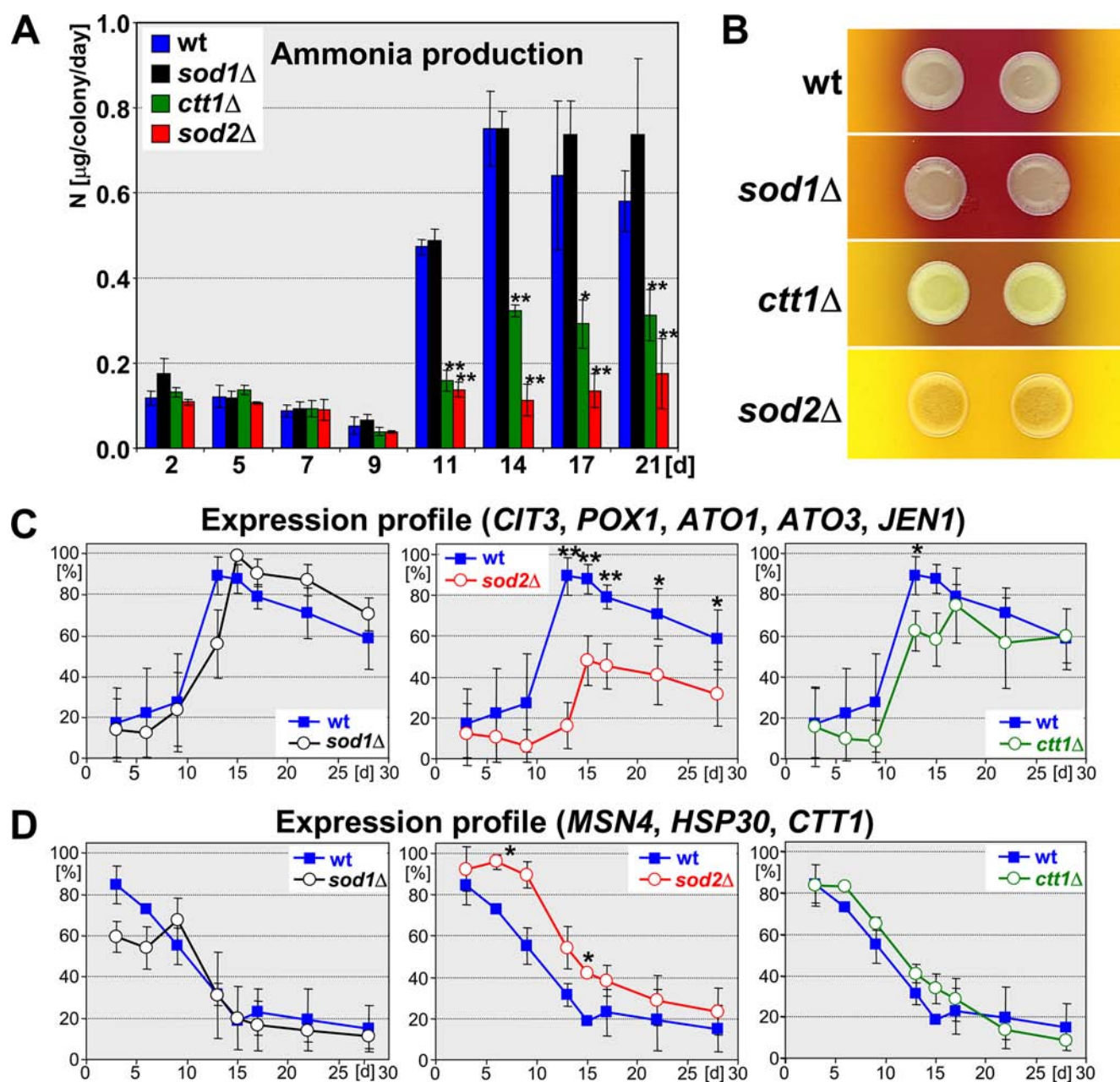


FIGURE 1. Colonies formed by strains deficient in individual stress defense enzymes differ in ammonia signaling and in related metabolic changes. *A*, ability of wt, *sod1Δ*, *sod2Δ*, and *ctt1Δ* colonies to produce ammonia over 21 days (x axis). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ when mutant and wt values were compared. *B*, morphology of colonies growing on GMA-bromocresol purple. Intensity of violet coloring of pH indicator bromocresol purple correlates with the extent of alkalinization. *C*, colony ability to activate adaptive changes in metabolic and transporter genes demonstrated as average change in expression of *CIT3*, *POX1*, *ATO1*, *ATO3*, and *JEN1* genes. *D*, expression profile of stress-related genes demonstrated as average change in expression of *MSN4*, *HSP30*, and *CTT1* genes. For each gene in *C* and *D*, the time point exhibiting the highest expression value was set as 100%. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; changes of particular genes are shown in supplemental Fig. S2.

nificantly higher in central than in outer cells, whereas it remained uniform within *sod2Δ* colonies (Fig. 2D). Similarly, Sod1p activity was significantly higher in central than outer wt cells but homogeneous among both *sod2Δ* colony regions (Fig. 2E). Sod1p activity transiently increased in the central region of *ctt1Δ* colonies during their transition to the abortive alkali phase (Fig. 2E). Interestingly, both enzyme activities of central *sod2Δ* cells were lower than those of central wt cells.

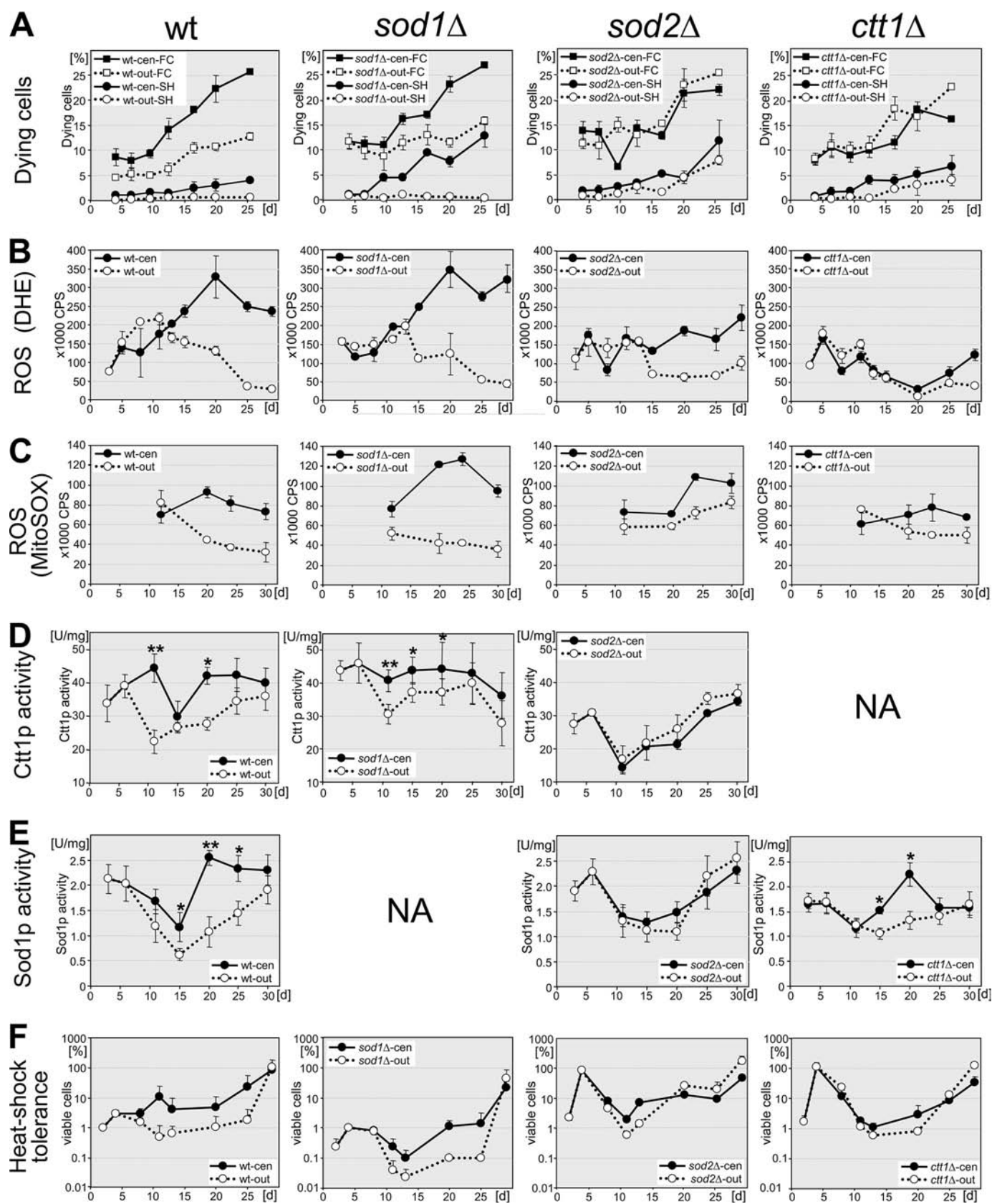
Variations in scavenging enzymatic activities can influence cell sensitivity to different stresses inducing ROS pro-

duction. It was shown, for example, that *sod1Δ* is more sensitive to heat shock, presumably because of increased ROS production at elevated temperature (7). Heat shock tolerance of central and outer cells from both wt and *sod1Δ* colonies differed significantly (Fig. 2F). The survival rate of central cells was 10 times higher than that of outer cells from alkali phase and second acidic phase colonies after exposure to 52 °C for 150 min. Despite the similar trend, both central and outer cells from *sod1Δ* colonies were ~5–10 times more sensitive to the heat shock than wt cells. In contrast, there was no difference in heat shock sensitivity between central

How to Survive within Yeast Colonies

and outer cells from *sod2Δ* and *ctt1Δ* colonies (Fig. 2F). Surprisingly, cells from *sod2Δ* and *ctt1Δ* colonies were in general relatively resistant.

The above data show that the distribution of cells harboring dying and stress-related characteristics differed in the central and margin regions of ammonia-producing *sod1Δ* and wt col-



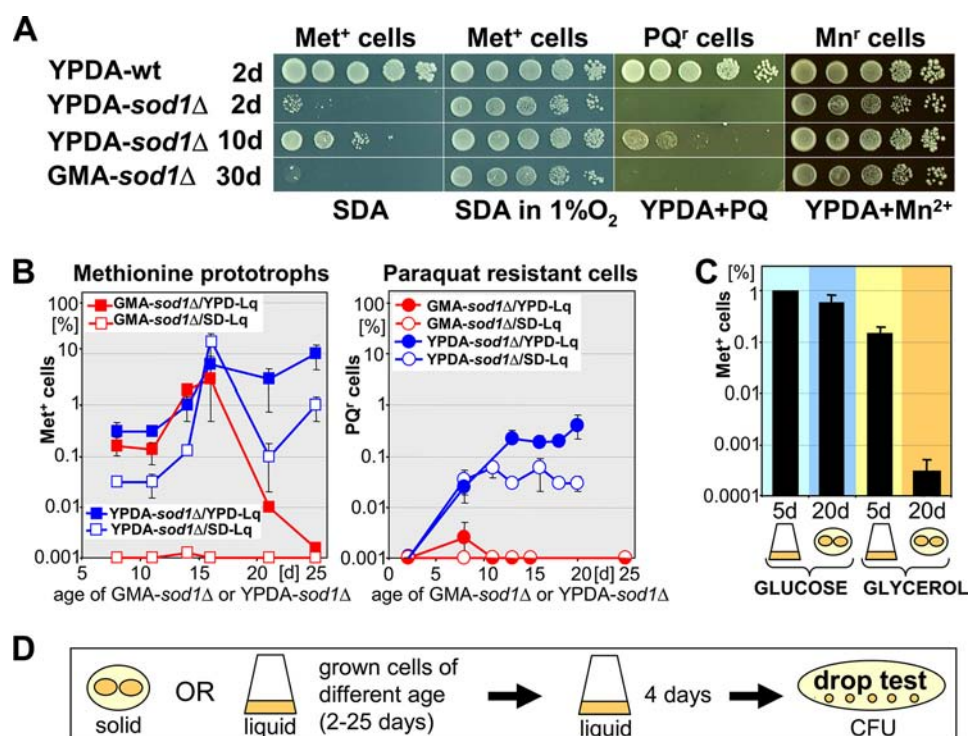


FIGURE 3. GMA-grown *sod1Δ* colonies do not accumulate stress-resistant suppressor mutants. A, wt and *sod1Δ* cells grown on solid media, as indicated, were directly assayed by drop test for the presence of Met⁺ and PQ⁺ suppressants and for Mn²⁺ sensitivity. B, ability of GMA-*sod1Δ* (red) and YPDA-*sod1Δ* (blue) cells, respectively, of various ages (as indicated on x axis) to form Met⁺ and PQ⁺ suppressants when subsequently growing in either SD (SD-Lq) or YPD (YPD-Lq) liquid media for 4 days (assayed by drop test). The number of cells detected by drop test on control YPDA plates without Paraquat was set as 100% at each time point. A representative experiment of four is shown. S.D. values were calculated from measurements of the three independent samples. C, capacity of *sod1Δ* cells pregrown for 5 or 20 days (d) either in liquid or on solid glucose (YPD or YPDA) or glycerol (GM or GMA) media to form Met⁺ cells in SD over 4 days (assayed by drop test). Pictograms under the x axis symbolize pregrowth conditions. The total number of cells determined by drop test on control YPDA was set as 100% (usually 10⁵ cells, approximately). D, the scheme of the experimental set-up.

onies. In contrast, there was little or even no difference in their distribution in *sod2Δ* and *ctt1Δ* colonies, which are incapable of ammonia signaling. In addition, contrary to liquid cultures, there was no increase in ROS and/or ROS-scavenging enzymes in colonies deficient in these enzymes. In fact, levels of ROS and of scavenging enzymes were even decreased in some cases. To determine whether the activation of some other stress defense mechanisms could be responsible for compensating the lack of superoxide dismutases or catalase, we measured glutathione peroxidase and peroxiredoxin activities. As shown in [supplemental Fig. S5](#), these activities in cells harvested from 23- and 30-day-old colonies were approximately the same among all strains.

***Sod1p*-deficient Colonies Do Not Accumulate Suppressor Mutants Resistant to Extracellular or Intracellular Oxidative Stress**—Surprisingly, in contrast to the absence of mitochondrial Sod2p, the absence of cytosolic Sod1p was accompanied by no visible defect in colony development and long term sur-

vival, despite the fact that *sod1Δ* colonies were grown aerobically on respiratory glycerol medium GMA. In sharp contrast, it has been shown previously that the absence of Sod1p leads to pleiotropic defects in liquid yeast cultures (e.g. increased sensitivity to oxygen and various stresses, slow growth, and rapid cell dying) (7–9) ([supplemental Fig. S1A](#)) and to high rate appearance of suppressor mutants resistant to oxidants and exhibiting reversal of methionine auxotrophy (10, 11). To determine whether the wt-like behavior of GMA-grown *sod1Δ* colonies could be caused by the high accumulation rate of stress-resistant suppressor mutants, we tested the sensitivity of cells harvested from *sod1Δ* colonies to the superoxide-producing agent Paraquat (an extracellular stressor). We also monitored whether these cells still exhibit Met auxotrophy (a result of intracellular oxygen stress (10)) under aerobic conditions. As shown in [Fig. 3A](#), even *sod1Δ* cells from 30-day-old GMA-grown colonies (GMA-*sod1Δ*) still exhibited high sensitivity to Paraquat and Met auxotrophy at normoxic O₂. They were not hypersensitive to extracellular

Mn²⁺. In contrast, a 10-day-old *sod1Δ* colony grown on YPDA glucose agar (YPDA-*sod1Δ*) contained ~1% Paraquat-resistant cells (PQ⁺) and 5% methionine prototrophic (Met⁺) cells (0.1% of Met⁺ cells was observed even in a fresh 2-day-old YPDA-*sod1Δ* colony). These data demonstrate that *sod1Δ* cells from aged GMA-grown colonies exhibited neither of the characteristics typical of either of the two previously described groups of suppressor mutations (*bsd* and *seo*) (10, 11) nor any other suppressor mutation that would increase their resistance to either extracellular or intracellular oxidative stress.

Physiology of *sod1Δ* Cells from GMA-grown Colonies Differs from That of the Original *sod1Δ* Strain—The data described above excluded the accumulation of oxidative stress-resistant mutants in GMA-grown *sod1Δ* colonies. An interesting possibility remained, however, that cells within these colonies either transiently adapt or acquire mutation(s), resulting in properties optimal for their existence within this multicellular structure.

FIGURE 2. Center margin cell differentiation does not occur in *sod2Δ* and *ctt1Δ* colonies but does in *sod1Δ* colonies. A, presence of cells with diffuse fragmented or dispersed chromatin (FC) and partially digested shrunken cells (SH) (representatives of cell types are shown in [supplemental Fig. S3A](#)). B, level of cellular superoxide (measured with DHE) (comparison of DHE determination by spectrofluorometer with fluorescence microscopy is shown in [Fig. S3B](#)). C, level of mitochondrial superoxide (measured with MitoSOX Red). The values in the central and margin regions of wt and *sod1Δ* colonies significantly differ ($p < 0.05$ or lower) after day 10 in A and after day 15 in B and C. D, activity of Ctt1p. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. E, activity of Sod1p. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. F, heat shock tolerance (survival of untreated cells is set as 100%) in central and outer cells in developing wt, *sod1Δ*, *sod2Δ*, and *ctt1Δ* colonies. x axis, days of colony development (ld). NA, no activity detected as the gene for the particular enzyme is absent; CPS, counts/s; cen, central cells; out, outer margin cells.

How to Survive within Yeast Colonies

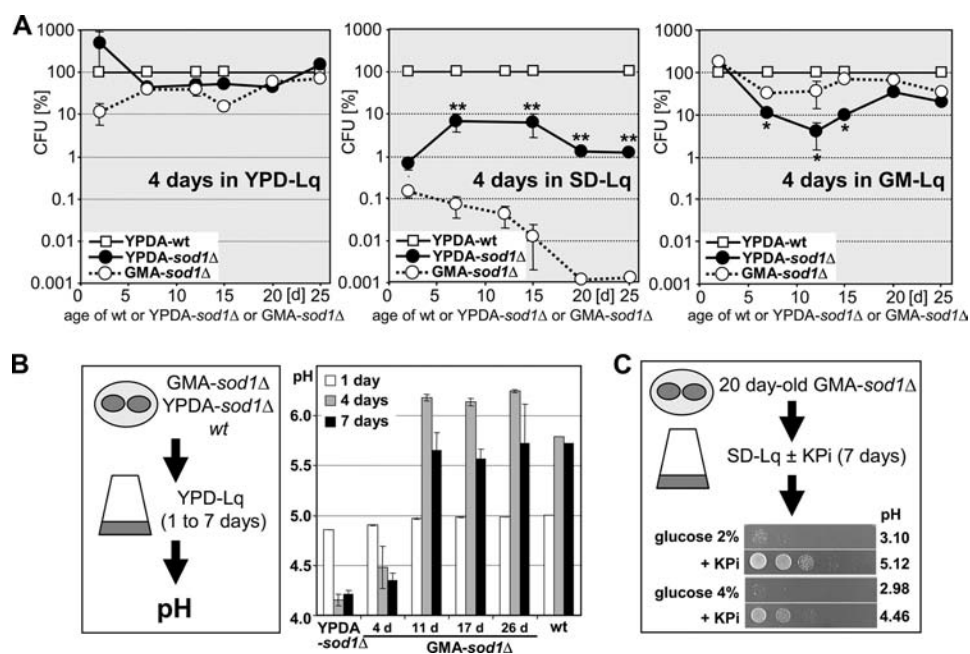


FIGURE 4. GMA-*sod1Δ*-derived liquid cultures differ in viability and pH from YPDA-*sod1Δ* cultures. **A**, survival of GMA-*sod1Δ* cells from colonies of various ages (days, x axis) when subsequently growing in liquid complex glucose (YPD-Lq), minimal glucose (SD-Lq), and complex glycerol (GM-Lq) media for 4 days (assayed by drop test). Survival of YPDA-*sod1Δ* cells of the same age is given in parallel. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. GMA-*sod1Δ* versus YPDA-*sod1Δ*. The number of YPDA-wt (wt cells from YPDA) living cells is set as 100% for each time point. The ratio of GMA-*sod1Δ* survival in comparison with that of the YPDA-*sod1Δ* cells is given in [supplemental Fig. S6](#). **B**, pH of the YPD after 1–7 days of cultivation of GMA-*sod1Δ* cells of various ages (x axis) and 3-day-old wt and YPDA-*sod1Δ* cells. **C**, survival of 20-day-old GMA-*sod1Δ* cells in SD (SD-Lq) with 2% or 4% glucose as carbon source, buffered to higher pH (+ KPi) or unbuffered. Survival was estimated after 7 days of cultivation. The pH of each 7-day-old culture is given.

To investigate this possibility, we compared *sod1Δ* cells forming colonies capable of ammonia signaling with *sod1Δ* cells forming colonies under conditions that do not lead to ammonia signaling. In these experiments, we harvested cells either from *sod1Δ* colonies grown on solid GMA as described above (GMA-*sod1Δ* cells, *i.e.* those cells undergoing ammonia-guided development) or from *sod1Δ* colonies grown on solid glucose-based YPDA (YPDA-*sod1Δ*; *i.e.* those cells incapable of development leading to ammonia signaling) of the same ages. We subsequently inoculated these cells into various liquid media, and we monitored their growth rates, the pH levels of the cultivation media, and cell survival (*i.e.* number of colony-forming cells). In parallel, we analyzed the appearance of PQ^r and Met⁺ suppressant cells in these liquid cultures.

After 24-h cultivation in the particular liquid medium (SD, YPD, or GM), the cultures inoculated with either GMA- or YPDA-*sod1Δ* reached similar densities (data not shown). However, prolonged cultivation revealed different viability for GMA-*sod1Δ* cultures as compared with the viability of YPDA-*sod1Δ* cultures. The survival of GMA-*sod1Δ* cells was only 1–10% after 4 days in liquid SD when compared with YPDA-*sod1Δ* cells (Fig. 4A and [supplemental Fig. S6](#)). In contrast to SD, GMA-*sod1Δ* and YPDA-*sod1Δ* cells exhibited similar viability in complex glucose YPD. The glycerol GM even favored GMA-*sod1Δ* over YPDA-*sod1Δ* (Fig. 4A and [supplemental Fig. S6](#)). Furthermore, in YPD, cells taken from GMA- and YPDA-grown colonies differed in their ability to change the pH of the cultivation medium. YPDA-*sod1Δ*-derived liquid cultures (similarly to original *sod1Δ*) acidified the medium from pH 5.5

to 4.2, whereas cultures inoculated with GMA-*sod1Δ* increased pH up to 6.2 (Fig. 4B). Hence, we tested whether higher pH improves poor survival of GMA-*sod1Δ* cells in liquid SD. Indeed, stabilizing pH of SD at about 5 increased GMA-*sod1Δ*-derived culture viability by 1–2 orders of magnitude (Fig. 4C).

Another striking difference between GMA-*sod1Δ* and YPDA-*sod1Δ* is connected to their abilities to form Met⁺ and PQ^r suppressants. Although both SD and YPD cultures inoculated with YPDA-*sod1Δ* accumulated relatively high numbers of Met⁺ cells, the occurrence of these cells in GMA-*sod1Δ*-derived cultures was significantly diminished (Fig. 3B). When growing in YPD, GMA-*sod1Δ*-derived cultures (from 20–25-day-old colonies) produced less than 1% of the Met⁺ suppressants of those found in YPDA-*sod1Δ* cultures. No Met⁺ suppressants were detected in GMA-*sod1Δ* cultures growing in SD. Similarly, in contrast to YPDA-*sod1Δ* cultures accumulating significant levels of PQ^r suppressants, no PQ^r cells were detected in GMA-*sod1Δ* cultures growing in either YPD or SD media (Fig. 3B).

Because the GMA and YPDA differ in their carbon source (glycerol and glucose, respectively), we tested whether the novel behavior of GMA-*sod1Δ* cells was a mere consequence of using glycerol medium. To explore this possibility, we compared the properties of *sod1Δ* cells from colonies grown on GMA (GMA-*sod1Δ*) with those of *sod1Δ* cells grown in liquid glycerol GM. We inoculated both cell types into liquid SD and determined survivors and Met⁺ suppressants after 4 days of cultivation. As shown in Fig. 3C, *sod1Δ* pregrown in liquid GM more closely resembled YPDA-*sod1Δ* cells and significantly differed from GMA-*sod1Δ* cells pregrown on GMA. *sod1Δ* cultures pregrown 5 days in liquid GM accumulated 100 to 1,000 times more Met⁺ suppressants during subsequent cultivation in SD than GMA-*sod1Δ* culture derived from 20-day-old colonies. In addition, in contrast to GMA-*sod1Δ* cultures, liquid GM-pregrown *sod1Δ* cultures were able to accumulate PQ^r suppressants and did not exhibit a decreased survival rate after prolonged cultivation (even after 9 days) in SD (data not shown). These experiments show that new GMA-*sod1Δ* traits are not merely induced by either a carbon source or a solid medium but are rather specific for GMA-grown colonies.

An Epigenetic Change or a Mutation?—In independent experiments, GMA-*sod1Δ* cells always developed the specific physiological properties described above, setting themselves apart from all other *sod1Δ* cultures. As a rule, GMA-*sod1Δ*-specific traits were gradually intensified as GMA-grown *sod1Δ* colonies aged. Moreover, at least some of the properties were

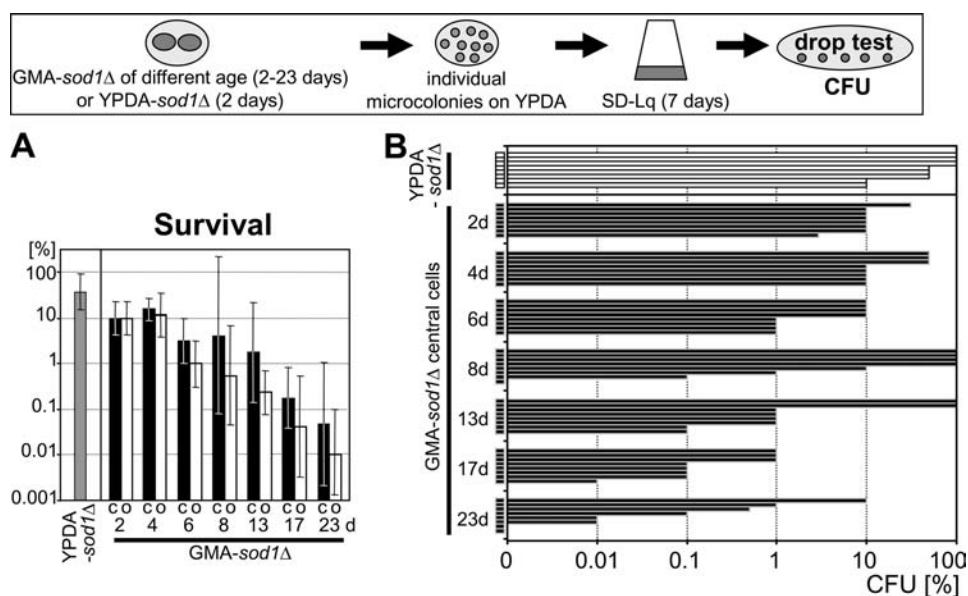


FIGURE 5. Properties of individual clones obtained from GMA-grown *sod1Δ* colonies of various ages. A, average survival of clones obtained from central (c) or outer (o) margin regions of GMA-*sod1Δ* colonies of various ages (x axis) after 7 days of cultivation in liquid SD (SD-Lq), as determined by drop assay. Survival of clones derived from 3-day-old YPDA-*sod1Δ* strain is given for comparison. The data are the means \pm S.D. of values obtained for eight independent clones at each time point. Survival of the particular clone after 24 h of cultivation in SD is set as 100%. B, survival of the eight individual clones obtained from central GMA-*sod1Δ* colony regions under the same conditions as in A. Survival of eight individual clones of 3-day-old YPDA-*sod1Δ* colony is given for comparison.

preserved even after the cells were removed from the colony context and cultivated in liquid media (e.g. the inability to form oxidative stress-resistant suppressants was maintained over 7 days of cultivation in different liquid media). This suggested that the physiological change in GMA-*sod1Δ* cells is relatively stable, being thus either a mutation or a stable epigenetic change. To determine how the GMA-*sod1Δ* specific traits are acquired, we characterized the phenotypes of individual cell clones obtained from either central or margin regions during colony development. We monitored cell viability in SD as the main indicator of changed GMA-*sod1Δ* physiology. The procedure was as follows (Fig. 5). We harvested cells from the central or margin regions of GMA-*sod1Δ* colonies, plated them on YPDA, and picked up individual clones. We then inoculated the clones into SD and analyzed cell viability after 7 days of cultivation. As shown in Fig. 5A, the average survival of individual cell clones decreased as the colony aged, being only slightly higher for clones obtained from the central colony region than for those from the colony margin. When assessing survival of individual clones in SD, however, it became evident that the population within the colony exists in many intermediate stages between original *sod1Δ* cells and fully changed GMA-*sod1Δ* cells (Fig. 5B and supplemental Fig. S7). Thus, in young *sod1Δ* GMA-grown colonies, most of the cells resembled original *sod1Δ*, but there were also some cells exhibiting partially decreased viability when growing in SD (the difference in survival was 1–2 orders of magnitude). The number of these cells increased during colony aging, and new cells with an even lower viability in SD (the difference in survival being 3–5 orders of magnitude) started to appear. Old GMA-*sod1Δ* colonies were mostly comprised of cells with very low viabilities in SD, but they also contained cells with almost the original viability in SD.

The profile of this gradual change was similar in central (Fig. 5B) and outer regions (supplemental Fig. S7) of the GMA-*sod1Δ* colony.

DISCUSSION

Regarding liquid yeast cultures, it is taken as a rule that the life span is proportional to the oxidant scavenging capability of yeast cells. Accordingly, all three stress defense mutants *sod1Δ*, *sod2Δ*, and *ctt1Δ* exhibit a reduced life span when growing in liquid YPD or ethanol cultures (4, 24). Our data imply, however, that in colonies passing through ammonia-guided development, the fate and survival of the population is governed more by its ability to undergo proper development than by its capacity to defend against oxidative stress (Fig. 6). *sod1Δ*, *sod2Δ*, and *ctt1Δ* strains should be expected to contain more ROS (O_2^- and/or H_2O_2) than the wt, particularly when growing on a res-

piratory medium. In fact, however, the cells of *sod2Δ* and *ctt1Δ* colonies growing on glycerol GMA agar do not markedly increase their cellular or mitochondrial superoxide levels as compared with wt colonies. Moreover, the absence of any Sod1p, Sod2p, or Ctt1p enzymes in colonies is not compensated by an increased level of either glutathione peroxidase or peroxiredoxin activity.

The absence of Ctt1p, Sod1p, or Sod2p has diverse impacts on the development and survival of yeast colonies. A defect in mitochondrial Sod2p (and to some extent also of cytosolic Ctt1p) significantly impairs ammonia signaling, as well as induction of adaptive metabolism and cell differentiation in aged colonies. The latter is documented by the finding that *sod2Δ* (and partially also *ctt1Δ*) colonies fail to localize dying cells and cells harboring stress-related features specifically to the colony center. On the contrary, these cells are spread throughout the whole colony. *sod2Δ* colonies defective in a single metabolic enzyme thus resemble to some extent colonies formed by the strain deficient in the pleiotropic transcription regulator Sok2p (16, 17) (Fig. 6). In addition to all of the defects mentioned above for *sod2Δ* colonies, *sok2Δ* colonies exhibit misbalanced levels of different stress-related factors (e.g. activities of superoxide dismutase and catalase) (17). Hence, one can speculate that an imbalance in ROS homeostasis (e.g. in mitochondria) of cells in acidic phase colonies may disrupt the initiation and/or continuation of physiological changes leading to ammonia signaling. Moreover, a stress defense enzyme itself could also play a regulatory role, because it was recently proposed that Sod2p regulates the proteins involved in chromatin remodeling and plays a role in sensing redox imbalance (25). Alternatively, superoxide radicals arising in *sod2Δ* mitochondria could cause oxidative damage of mitochondrial compo-

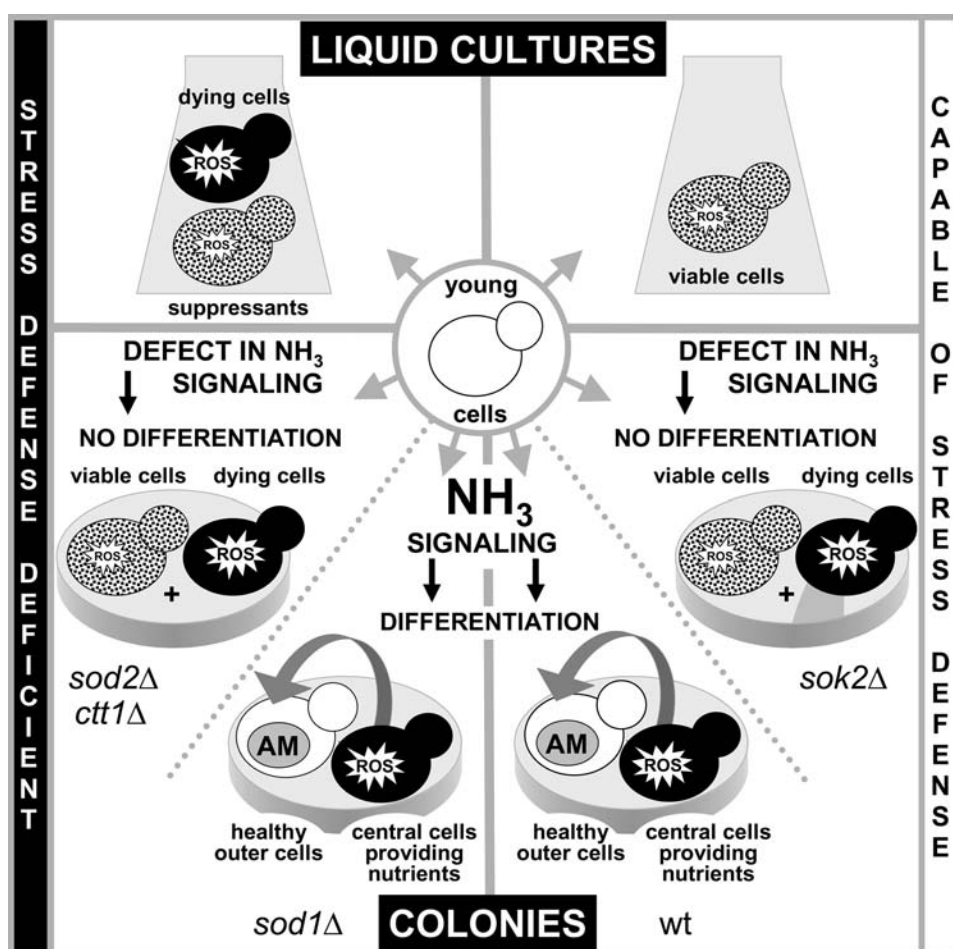


FIGURE 6. Model of involvement of stress defense and adaptive metabolism in development and survival of different yeast populations. The cultivation of all population types starts with "chronologically young" cells. Stress defense is essential in liquid cultures to scavenge ROS. Its absence can be overcome by accumulating stress-resistant suppressants. In colonies, independently of stress defense enzymes, cells capable of ammonia signaling undergo a development leading to their differentiation, activation of adaptive metabolism (AM) and long term survival of healthy cells located at margin colony regions. This is the case of wt and *sod1Δ* colonies. Lack of ammonia signaling causes developmental problems, i.e. no differentiation and reduced fitness of the whole colony population both in the presence and absence of stress defense mechanisms. This occurs in colonies of stress defense mutants *sod2Δ* and *ctt1Δ* as well as in colonies of the *sok2Δ* mutant defective in pleiotropic regulator Sok2p (17).

nents, including proteins, which were proposed to be involved in the release of NH_4^+ from amino acids (e.g. Gcv1–3p and Gln1p) (15). This could result in a drop of ammonia production and insufficient activation of important metabolic changes. Some highly carbonylated mitochondrial proteins were observed in the *sod2Δ* mutant (26).

In contrast to a deficiency in mitochondrial Sod2p, the absence of cytosolic Sod1p does not cause the GMA-grown colonies any significant developmental or survival problem despite the fact that this enzyme appears to be the most essential of the three for yeast cells growing in liquid cultures. Despite growing on a complex glycerol respiratory medium, the *sod1Δ* population within the colony does not suffer, and the outer cells are fully viable. *sod1Δ* colonies produce an amount of ammonia comparable with that of the wt colonies, induce the adaptive metabolic changes normally, and exhibit clear center margin differentiation. In contrast to *sod1Δ* liquid cultures accumulating stress-resistant suppressant mutants, GMA-grown *sod1Δ* cells retain

their sensitivity to oxidative stress and heat shock. Nevertheless, GMA-grown *sod1Δ* cells acquire new traits, which are preserved even when they are transferred to new liquid growth conditions. These include an altered physiology and survival in some liquid media and preserved loss of ability to form stress-resistant suppressants. Neither *sod1Δ* cultures growing in glycerol GM or glucose YPD liquid media nor *sod1Δ* colonies growing on glucose solid YPDA acquire similar properties. All of these *sod1Δ* populations resemble original *sod1Δ* cells. These data imply that the fitness of GMA-*sod1Δ* cells results from their life history within the GMA-grown colony undergoing ammonia-guided development.

In contrast to developmental differences between colonies formed by individual stress defense mutants, which appear to be connected to the capability of a colony for ammonia signaling, the development of new traits of GMA-grown *sod1Δ* cells start already in young first acidic phase colonies. These traits reproducibly intensify with colony age in both chronologically aged central and in newly grown outer cells, suggesting that the changes are not necessarily connected with cell division. The analysis of individual clones obtained from GMA-*sod1Δ* colonies of various ages implies that colonial *sod1Δ*

cells occur in several intermediate stages before they reach what may be termed the "colony-adapted" form. This indicates that a single mutation is unlikely to be responsible for the change and suggests that the change could be related to a successive epigenetic switch and gradual cell adaptation. Such a switch in its final stage, however, must be quite stable, because it persists at least 15 generations after cell removal from the colony context (data not shown). Proteins involved in chromatin remodeling may participate in such epigenetic change (27). Some of the chromatin-remodeling genes and genes located in subtelomeric regions were found to change expression during colony development (15, 28). Of course, one cannot exclude the alternative possibility that more than one mutation accumulates in GMA-*sod1Δ* cells, but these mutations should always result in the same colony-adapted phenotype. Because *sod1Δ* is known to have a high rate of spontaneous mutations (8, 29), this possibility could also be feasible.

Taken together, our new findings indicate that the differentiation of the colony cell population and activation of the proper

metabolism, which allow intracellular stress to decrease naturally, is more important for the long term survival of the population than the presence and function of mechanisms dealing with an already increased stress. Moreover, the finding that mitochondrial Sod2p (and possibly Ctt1p) may be involved in the regulatory processes leading to ammonia signaling makes colonial population an excellent model for studies of the regulatory and additional metabolic functions of distinct stress defense enzymes and different kinds of ROS in particular. The absence of oxidative stress-resistant suppressants in GMA-grown *sod1Δ* colonies and the appearance of either mutated or switched clones show that yeast populations in colonies passing through specific developmental phases and in liquid shaken cultures are exposed to different selection pressures and need to acquire different capabilities (Fig. 6).

Acknowledgments—We are grateful to A. Pineda Rodó and V. Závada for critical reading of the manuscript. We thank S. Pokorná and H. Žd'árská for excellent technical assistance.

REFERENCES

- Eberhardt, M. K. (2001) *Reactive Oxygen Metabolites: Chemistry and Medical Consequences*, pp. 303–365, CRC Press, Boca Raton, FL
- Izawa, S., Inoue, Y., and Kimura, A. (1996) *Biochem. J.* **320**, 61–67
- Schüller, C., Brewster, J. L., Alexander, M. R., Gustin, M. C., and Ruis, H. (1994) *EMBO J.* **13**, 4382–4389
- Van Zanduycke, S. M., Sohler, P. J., and Smart, K. A. (2002) *Mech. Ageing Dev.* **123**, 365–373
- Guaragnella, N., Antonacci, L., Giannattasio, S., Marra, E., and Passarella, S. (2008) *FEBS Lett.* **582**, 210–214
- Westerbeek-Marres, C. A., Moore, M. M., and Autor, A. P. (1988) *Eur. J. Biochem.* **174**, 611–620
- Davidson, J. F., Whyte, B., Bissinger, P. H., and Schiestl, R. H. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 5116–5121
- Gralla, E. B., and Valentine, J. S. (1991) *J. Bacteriol.* **173**, 5918–5920
- Longo, V. D., Gralla, E. B., and Valentine, J. S. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 12275–12280
- Strain, J., Lorenz, C. R., Bode, J., Garland, S., Smolen, G. A., Ta, D. T., Vickery, L. E., and Culotta, V. C. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 31138–31144
- Lapinskas, P. J., Cunningham, K. W., Liu, X. F., Fink, G. R., and Culotta, V. C. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 1382–1388
- Nadell, C. D., Xavier, J. B., and Foster, K. R. (2009) *FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 206–224
- Palková, Z., and Váchová, L. (2006) *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 806–824
- Palková, Z., Janderová, B., Gabriel, J., Zikánová, B., Pospíšek, M., and Forstová, J. (1997) *Nature* **390**, 532–536
- Palková, Z., Devaux, F., Ricicova, M., Mináriková, L., Le Crom, S., and Jacq, C. (2002) *Mol. Biol. Cell* **13**, 3901–3914
- Váchová, L., and Palková, Z. (2005) *J. Cell Biol.* **169**, 711–717
- Váchová, L., Devaux, F., Kucerová, H., Ricicová, M., Jacq, C., and Palková, Z. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 37973–37981
- Beauchamp, C., and Fridovich, I. (1971) *Anal. Biochem.* **44**, 276–287
- Clare, D. A., Duong, M. N., Darr, D., Archibald, F., and Fridovich, I. (1984) *Anal. Biochem.* **140**, 532–537
- Kim, K., Kim, I. H., Lee, K. Y., Rhee, S. G., and Stadtman, E. R. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 4704–4711
- Netto, L. E., Chae, H. Z., Kang, S. W., Rhee, S. G., and Stadtman, E. R. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 15315–15321
- Palková, Z., Váchová, L., Gásková, D., and Kucerová, H. (2009) *Mol. Membr. Biol.* **26**, 228–235
- Perrone, G. G., Tan, S. X., and Dawes, I. W. (2008) *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 1354–1368
- Wawryn, J., Krzepilko, A., Myszk, A., and Bilinski, T. (1999) *Acta Biochim. Pol.* **46**, 249–253
- Bonatto, D. (2007) *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 557–567
- O'Brien, K. M., Dirmeier, R., Engle, M., and Poyton, R. O. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 51817–51827
- Bühler, M., and Gasser, S. M. (2009) *EMBO J.* **28**, 2149–2161
- Váchová, L., Kucerová, H., Devaux, F., Ulehlová, M., and Palková, Z. (2009) *Environ. Microbiol.* **11**, 494–504
- Fabrizio, P., Battistella, L., Vardavas, R., Gattazzo, C., Liou, L. L., Diaspro, A., Dossen, J. W., Gralla, E. B., and Longo, V. D. (2004) *J. Cell Biol.* **166**, 1055–1067

5.2 Publikace II

How to survive within a yeast colony? Change metabolism or cope with stress?

Michal Čáp, Libuše Váchová a Zdena Palková

Communicative and Integrative Biology (2010) March-April; 3(2): 198–200.

bez IF

Tento článek je dodatkem k publikaci I, kde nám bylo umožněno shrnout výsledky publikované ve zmíněném článku a uvést zde i některé spekulace, modely a hypotézy, které se nevešly do původního článku. Je zde představen model o rozdílné úloze genů stresové ochrany v koloniích a třepaných tekutých kulturách. Zatímco v posledně jmenovaných je přežití populace závislé na ochraně před oxidativním stresem, v koloniích je zřejmě stresová ochrana méně významná a důležitější úlohu hraje metabolická adaptace.

How to survive within a yeast colony?

Change metabolism or cope with stress?

Michal Čáp,¹ Libuše Váchová^{2,1} and Zdena Palková^{1,*}

¹Department of Genetics and Microbiology; Faculty of Sciences; Charles University in Prague; Prague, Czech Republic; ²Institute of Microbiology AS CR; Prague, Czech Republic

Yeast colonies growing on solid medium begin at a particular point in their development to produce volatile ammonia and to alkalize their surroundings.¹ Ammonia serves as a long-range signal between neighboring colonies and was shown to influence various aspects of colony biology including metabolic reprogramming and differentiation. In a recent paper we presented the impact of deleting of key stress defense enzymes on ammonia signaling and colony development. New findings suggest that it is not stress defense, but rather proper development guided by ammonia signaling and related metabolic changes that are important factors in the long-term survival of a colony cell population.

Ammonia signaling was found to be connected with extensive expression changes² including metabolic reprogramming consisting of the repression of mitochondrial oxidative phosphorylation and the mitochondrial tricarboxylic acid cycle alongside the activation of amino acid and nucleotide metabolism and some poorly understood branches of carbon metabolism (e.g., genes *ICL2*, *CIT3*, *FDH1*) and transport (e.g., genes *ATO1*, *ATO2*, *ATO3*, *JEN1*). In parallel, the expression of stress-related genes, including those for oxidative stress defense enzymes, falls during colony development. This is rather surprising, since in liquid cultures aging results in stress factor accumulation, and the culture fitness is proportional to stress defense enzyme activities. What is then the importance of stress defense in colonies?

Studies of the differentiation between central and margin region cell populations of the colony revealed that cells with apoptotic-like features (e.g., reactive oxygen species (ROS) production, chromatin fragmentation, half-empty shrunken cells) are restricted to the colony centre, leaving colony margin cells healthy and fully able to propagate the colony towards an uncolonized area.³ Similar centre-margin differences were found in the expression of various proteins and antioxidant enzyme activities.⁴ Hence, there is clear evidence that cells located in distinct colony regions differentiate and that the starting point of this differentiation approximately correlates with the initiation of ammonia production. This raises the question as to whether differentiation is connected to ammonia signaling.

Additional results came from studies of colonies with a deleted *SOK2* gene, which encodes for a transcription regulator involved in various physiological processes. Colonies of this *sok2Δ* strain were unable to produce ammonia or activate variety of metabolic genes typical for ammonia-connected metabolic reprogramming.⁵ Even more interesting was the fact that these colonies also have an impaired colony differentiation.³ Unlike in the wild type, there was only a slight difference between the *sok2Δ* colony central and margin cells in the studied parameters. Is this lack of centre-margin differentiation of *sok2Δ* colonies connected to the reduction in ammonia signaling and inability to undergo metabolic changes?

To answer these questions, we performed a detailed analysis of colonies

Key words: yeast colonies, stress defense and metabolic adaptation, differentiation, aging and long-term survival, ammonia signaling

Submitted: 12/22/09

Accepted: 12/22/09

Previously published online:
www.landesbioscience.com/journals/cib/article/11026

*Correspondence to: Zdena Palková;
Email: zdenap@natur.cuni.cz

Addendum to: Čáp M, Vachova L, Palkova Z. Yeast colony survival depends on metabolic adaptation and cell differentiation rather than on stress defense. *J Biol Chem* 2009; 284:32572–81; PMID: 19801643; DOI: 10.1074/jbc.M109.022871.

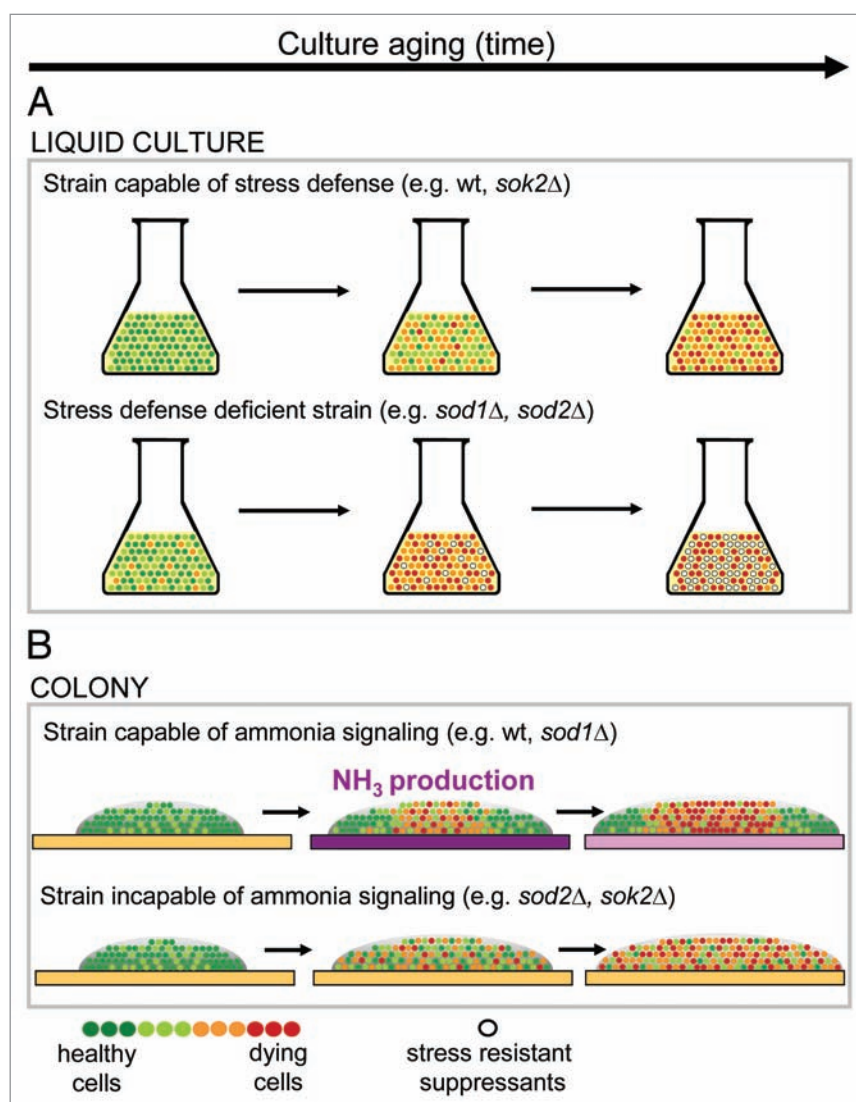


Figure 1. Different factors are important for survival in liquid cultures and in colonies. (A) Survival in liquid culture is dependent on stress defense. Stress-defense-deficient population dies rapidly unless stress-resistant mutants appear and overgrow the dying population. (B) Survival in a colony is dependent on metabolic adaptation of the population. Colony cell population switches metabolism as a result of ammonia signal which enables survival of cells at colony margin. Cells in colony centre die and provide nutrients for the benefit of cells at the colony margin. Development of a colony incapable of ammonia signaling is not orchestrated, cells are not able to activate their alternative metabolism and consequently cell death is spread throughout the whole colony. Color of the agar-medium indicates pH changes during colony development: yellow, pH below 6.5; violet, pH above 6.5.

formed by strains deleted in key enzymes of oxidative stress defense: i.e., *sod1Δ* deficient in cytosolic superoxide dismutase, *sod2Δ* lacking mitochondrial superoxide dismutase and *ctt1Δ* with the deletion of the gene for cytosolic catalase. As for their ability to produce ammonia and undergo ammonia related metabolic changes, *sod1Δ* was fully able to produce ammonia and activate genes typical for the ammonia-connected metabolic switch (e.g.,

CIT3, *ATO1*, *ATO3*, *JEN1*), while the *sod2Δ* strain was incapable of both ammonia production and sufficient induction of metabolic genes. Preliminary microarray data for the *sod2Δ* strain also revealed other similarities between *sod2Δ* and *sok2Δ* colonies at the transcriptional level, especially the lack of induction of amino acid, nucleotide and other metabolic changes typical for the ammonia-producing phase of wt colonies (unpublished data). Thus,

we had an experimental model where the deletion of a single enzymatic activity located in different compartments (cytosol vs. mitochondria) led to differing effects on ammonia signaling and the connected alternative metabolism activation. We then examined in detail the differentiation in several stress-related physiological parameters (ROS production, cell death occurrence, thermoresistance, activity of oxidative stress defense enzymes) between central and margin regions in colonies formed by oxidative-stress-impaired mutants. It turned out that center-margin differentiation is dependent on the ability of the particular strain to undergo the ammonia-mediated metabolic switch. Hence, in *sod2Δ* colonies we observed a similar consequence of the absence of ammonia signaling as in *sok2Δ* colonies: an inhibition of the activation of the metabolic changes and consequently an inhibition of *sod2Δ* colony differentiation. This complex colony phenotype was thus found in strains lacking two functionally unrelated proteins, the pleiotropic transcription regulator Sok2p and ROS scavenging enzyme Sod2p, indicating the key role of ammonia-guided metabolic and possibly other changes. This finding is also supported by observations of *ctt1Δ* colonies, which produce a reduced amount of ammonia and, correspondingly, exhibit a level of activation of metabolic changes as well as differentiation that is in-between the wt and *sod2Δ*. Interestingly, the overall level of ROS (superoxide or hydrogen peroxide) was not elevated in aging colonies of any of the stress-defense mutants compared to the wt colonies.

The above results raise the possibility that Sod2p and/or cellular ROS homeostasis are somehow involved in signaling pathways leading to ammonia production and the subsequent metabolic switch. This hypothesis predicts that a higher mitochondrial superoxide level in the early stages of colony development could somehow impair the onset of ammonia signaling. And indeed, in contrast to aging colonies, superoxide production is elevated in the mitochondria of very young *sod2Δ* colonies (1- and 3-day old colonies, unpublished data). One could imagine several mechanisms for the ROS imbalance effect, one of them being that

mitochondrial ROS could block or cross-talk with pathways leading to ammonia signaling. Several mitochondrial redox-sensing pathways were proposed in higher organisms that regulate either mitochondrial physiology or nuclear gene expression⁶⁻⁸ but none in yeast so far. Alternatively, mitochondrial ROS may act directly by damaging particular enzyme(s) necessary for ammonia generation. A number of amino acid metabolic genes are concentrated in mitochondria, many of which are induced during the ammonia-production phase. Since it has been shown that amino acid metabolism is source of ammonia,⁹ oxidative damage to some enzymes could affect ammonia production at the enzymatic level. Finally, *sod2Δ* could have another role in cellular signaling besides its enzymatic activity. Mitochondrial superoxide dismutase was recently suggested to have a regulatory role in DNA repair machinery and chromatin remodeling in yeast.¹⁰

Stress-defense-deficient mutants, especially *sod1Δ* and *sod2Δ*, are severely damaged in liquid cultivations, as documented by their slow growth, high ROS level and rapid cell dying.¹¹⁻¹³ In colonies, however, the situation is different. *sod2Δ* and *ctt1Δ* colonies (incapable of ammonia signaling) lack differentiation, which results in a large proportion of stressed and dead cells at the colony margin. In contrast, *sod1Δ*, the strain most damaged in liquid cultivations, is as prosperous as the wt under colonial conditions. Since the *sod1Δ* cell population is known to efficiently suppress defects evoked by oxidative stress by accumulating stress-resistant suppressor mutations, it was a surprise that no such

mutants were detected in *sod1Δ* colonies. *sod1Δ* cells taken from colonies, however, acquired some new heritably stable physiological features, such as different growth properties and survival rate in liquid cultures, showing that this strain, although developing in a colonial environment, is prone to changes (mutations or epigenetic switches). The lack of accumulation of stress-resistant suppressor mutants thus indicates that in colonies there is no selection pressure in favor of stress-resistant mutations. This demonstrates that completely different factors are important for survival in homogeneous, aerated, fast growing liquid shaken cultivations and in the differentiated multicellular population of a colony (Fig. 1). A colony represents a highly complex and heterogeneous population developing in an environment where gradients of various compounds, nutrients or gases form many different niches, where each cell occupies its particular space and cell-to-cell interactions are preserved. In this respect, the colonial model resembles to some extent the tissues of real multicellular organisms and could contribute to uncovering and understanding new aging and stress-related processes in slowly dividing or non-dividing differentiated cell populations.

Acknowledgements

This work was supported by Grant Agency of the Czech Republic (204/08/0718), by Ministry of Education (LC531, MSM0021620858 and AV0Z50200510) and by the Howard Hughes Medical Institute (International Research Award 55005623 to Z.P.).

References

1. Palkova Z, Janderova B, Gabriel J, Zikanova B, Pospisek M, Forstova J. Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* 1997; 390:532-6.
2. Palkova Z, Devaux F, Rიცოვა M, Minarikova L, Le Crom S, Jacq C. Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Mol Biol Cell* 2002; 13:3901-14.
3. Vachova L, Palkova Z. Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. *J Cell Biol* 2005; 169:711-7.
4. Vachova L, Kucerova H, Devaux F, Ulehlova M, Palkova Z. Metabolic diversification of cells during the development of yeast colonies. *Environ Microbiol* 2009; 11:494-504.
5. Vachova L, Devaux F, Kucerova H, Rიცოვა M, Jacq C, Palkova Z. Sok2p transcription factor is involved in adaptive program relevant for long term survival of *Saccharomyces cerevisiae* colonies. *J Biol Chem* 2004; 279:37973-81.
6. Balmer Y, Vensel WH, Tanaka CK, Hurkman WJ, Gelhaye E, Rouhier N, et al. Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:2642-7.
7. Storz P. Mitochondrial ROS-radical detoxification, mediated by protein kinase D. *Trends Cell Biol* 2007; 17:13-8.
8. Armstrong JS, Whiteman M, Yang H, Jones DP. The redox regulation of intermediary metabolism by a superoxide-aconitase rheostat. *Bioessays* 2004; 26:894-900.
9. Zikanova B, Kuthan M, Rიცოვა M, Forstova J, Palkova Z. Amino acids control ammonia pulses in yeast colonies. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294:962-7.
10. Bonatto D. A systems biology analysis of protein-protein interactions between yeast superoxide dismutases and DNA repair pathways. *Free Radic Biol Med* 2007; 43:557-67.
11. Davidson JF, Whyte B, Bissinger PH, Schiestl RH. Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:5116-21.
12. Longo VD, Gralla EB, Valentine JS. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *J Biol Chem* 1996; 271:12275-80.
13. Gralla EB, Valentine JS. Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu,Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates. *J Bacteriol* 1991; 173:5918-20.

5.3 Publikace III

Cell differentiation within a yeast colony: Metabolic and regulatory parallels with a tumor-affected organism

Michal Čáp, Luděk Štěpánek, Karel Harant, Libuše Váchová a Zdena Palková

Molecular Cell (2012) - v tisku

IF=14,194

Studiem tenkých řezů staršími koloniemi *S. cerevisiae* jsme objevili, že kolonie je ve vertikálním směru tvořena dvěma odlišnými vrstvami buněk. Horní vrstva je tvořena velkými, kulatými buňkami s tlustou buněčnou stěnou, několika vakuolami a několika lipidickými tělísky (U buňky). Mitochondrie těchto buněk jsou velké, je jich jen několik na buňku a, jak ukázala elektronmikroskopická analýza, mají málo krist. Buňky spodní vrstvy (L buňky) naproti tomu jsou menší s protáhlým tvarem, mají jednu velkou vakuolu a jedno malé lipidické tělísko a množství hojně kristovatých mitochondrií. Kolonie kmenů exprimujících vybrané enzymy a transportéry označené zeleným fluorescenčním proteinem měly velmi výrazně rozdílnou fluorescenci v horní a spodní vrstvě. Abychom byly schopni analyzovat i další charakteristiky těchto rozdílných buněčných typů, vypracovali jsme metodu separace těchto subpopulací. Využili jsme rozdílné velikosti těchto buněk a směsnou populaci buněk z kolonie jsme dělili zonální centrifugací v lineárním 10-35% gradientu sacharosy. Izolované subpopulace jsme charakterizovali po fyziologické, transkriptomické a metabolické stránce. U buňky jsou více resistantní proti teplotnímu a ethanolovému šoku a proti degradaci zymolysou. Všechny tyto znaky svědčí pro zesílení buněčné stěny u těchto buněk oproti L buňkám. Podstatné rozdíly byly i v metabolických charakteristikách obou buněčných typů. L buňky měly zvýšenou respiraci a také více exprimovaly geny spojené s mitochondriální respirací a glukoneogenezí a naměřili jsme u nich zvýšenou hladinu lysinu, GABA a alaninu. U buňky naproti tomu exprimovaly geny aminokyselinového a nukleotidového metabolismu, glykolýzy a pentoso-fosfátové dráhy. Zvýšená koncentrace glutaminu, kyseliny glutamové a argininu u těchto buněk potvrzují indukci aminokyselinového

metabolismu zaznamenanou na transkripční úrovni. Zvýšená exprese Ribi genů pro ribosomální proteiny v U buňkách svědčí pro aktivaci drah snímajících množství živin v okolí - TOR a/nebo Ras/cAMP/PKA dráhy. Celkový obraz je tedy takový, že U buňky, tvořící horní vrstvu diferencované kolonie, jsou metabolicky aktivní, stresově odolnou a lépe přežívající subpopulací v kolonii, zatímco L buňky jsou stresované, hladovějící a krátkověkou subpopulací. Metabolismus U buněk je nápadně podobný metabolismu buněk nádorového bujení.

Cell Differentiation within a Yeast Colony: Metabolic and Regulatory Parallels with a Tumor-Affected Organism

Michal Čáp,¹ Luděk Štěpánek,¹ Karel Harant,^{1,2} Libuše Váchová,² and Zdena Palková^{1,*}

¹Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, 128 44 Prague 2, Czech Republic

²Institute of Microbiology of the ASCR, v.v.i., 142 20 Prague 4, Czech Republic

*Correspondence: zdenap@natur.cuni.cz

DOI 10.1016/j.molcel.2012.04.001

SUMMARY

Nutrient sensing and metabolic reprogramming are crucial for metazoan cell aging and tumor growth. Here, we identify metabolic and regulatory parallels between a layered, multicellular yeast colony and a tumor-affected organism. During development, a yeast colony stratifies into U and L cells occupying the upper and lower colony regions, respectively. U cells activate a unique metabolism controlled by the glutamine-induced TOR pathway, amino acid-sensing systems (SPS and Gcn4p) and signaling from mitochondria with lowered respiration. These systems jointly modulate U cell physiology, which adapts to nutrient limitations and utilize the nutrients released from L cells. Stress-resistant U cells share metabolic pathways and other similar characteristics with tumor cells, including the ability to proliferate. L cells behave similarly to stressed and starving cells, which activate degradative mechanisms to provide nutrients to U cells. Our data suggest a nutrient flow between both cell types, resembling the Cori cycle and glutamine-NH₄ shuttle between tumor and healthy metazoan cells.

INTRODUCTION

Although traditionally viewed as unicellular organisms, yeast and bacteria are able to behave in a coordinated manner to form organized multicellular communities with unique properties. Examples include biofilms, colonies, aerial hyphae, and fruiting bodies, within which cells are able to differentiate into specific localized subpopulations possessing different characteristics (Palková and Váchová, 2006). In contrast to liquid cultures, multicellular structures possess gradients of different nutrients, metabolites, waste products, signaling molecules, and gases. In this manner, the cells within microbial multicellular structures resemble cells forming the highly organized and differentiated metazoan tissues.

During the past decade, *Saccharomyces cerevisiae* colonies have become an excellent model for studying various aspects

of microbial multicellularity, including cell differentiation and communication. Examples described thus far include the localization of sporulating cells to a specific part of a colony (Piccirillo et al., 2010) or in stalk-like colonies (Engelberg et al., 1998), cell location-dependent gene expression (Mináriková et al., 2001; Váchová et al., 2009a; Váchová et al., 2009b), or differences in the cell death rate and stress factors between the center and margin of the colony (Čáp et al., 2009; Váchová and Palková, 2005). Various diffusible signaling molecules have been reported to act in yeast, which include fusel (Dickinson, 1996) and aromatic (Chen and Fink, 2006) alcohols as regulators of pseudohyphal formation, bicarbonate-mediated medium alkalization as a signal to sporulate (Ohkuni et al., 1998) or signaling between colonies mediated by volatile ammonia (Palková et al., 1997). Signaling between colonies occurs in a particular phase of colony development and induces metabolic reprogramming, which is important for colony survival and center-margin colony differentiation.

Many central regulatory mechanisms and metabolic pathways, including those that sense nutrients, are evolutionarily conserved, and findings in simpler microbial multicellular models could therefore be crucial for the discovery of similar mechanisms in metazoans. In *S. cerevisiae*, there are several well-characterized nutrient-sensing pathways that couple nutrient availability with cellular metabolism, growth and the cell cycle. The Ras/cAMP/PKA pathway is primarily regulated by glucose levels, while the conserved TOR (target of rapamycin) and GCN (general control nonrepressed) pathways monitor the availability of amino acids (for a review, see Smets et al., 2010). Together with plasma membrane-associated amino acid sensor systems (e.g., the SPS sensor) (Hundal and Taylor, 2009), these mechanisms participate in monitoring the quantity and quality of extracellular and intracellular amino acids and enable cells to appropriately respond to the actual nutritional state. This response is important in yeast, but various findings link these mechanisms with crucial processes in metazoans, including a number of diseases and injury states (e.g., cachexia, uremia, and surgical trauma).

In this study, we describe the vertical differentiation of a yeast colony and identify two major cell subpopulations occupying specific regions of the colony. We characterize these two subpopulations in terms of cell ultrastructure, physiology, gene expression, and metabolism. Our data provide a multifaceted view of the metabolism and regulation specific to each

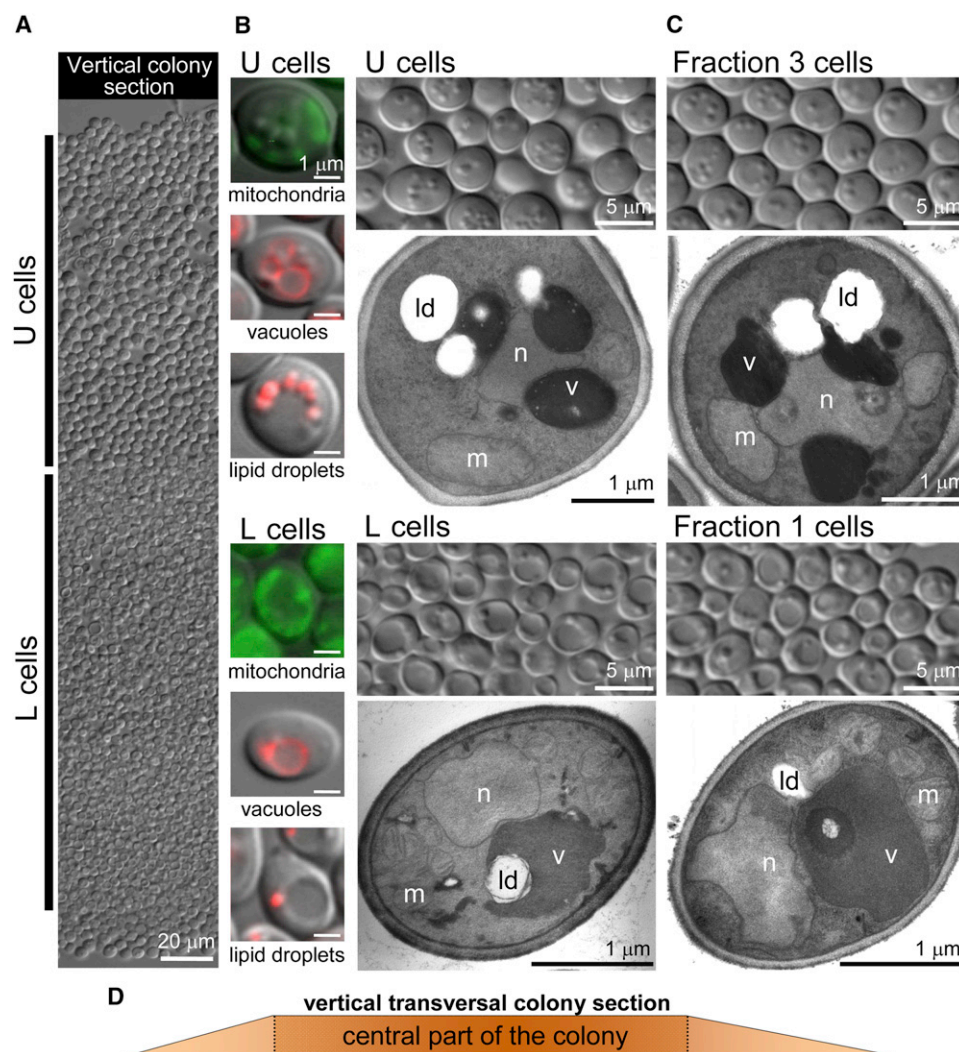


Figure 1. *S. cerevisiae* Colony Cells Differentiate into Two Morphologically and Physiologically Distinct Subpopulations

(A) Vertical transversal cross section of a 20-day-old BY4742 colony.

(B) Details of U and L cells visualized with Nomarski contrast, fluorescence, and transmission EM. Left panels: Mitochondria were stained with DiOC₆(3), vacuoles with FM4-64, and lipid droplets with Nile Red.

(C) Details of cells from fractions 1 and 3 visualized with Nomarski contrast and transmission EM.

(B and C) n, nucleus; v, vacuole; m, mitochondria; ld, lipid droplet.

(D) Center of the colony as shown by the scheme was examined throughout the study.

See also Figure S1.

subpopulation and highlight remarkable metabolic parallels with a mammalian tumor-affected organism. The results also suggest metabolite exchange between differentiated yeast cell types.

RESULTS

Cell Differentiation within a Developing Yeast Colony

Light microscopy (Nomarski contrast and fluorescence) and electron microscopy (EM) of vertical sections of central parts of *S. cerevisiae* colonies (Figure 1D) revealed cells that markedly differ in their morphology and ultrastructure, depending on their spatial location within the colony (Figures 1A and 1B). Beginning

on day 7, two major layers of cells became stratified within the colony. The upper (U) layer had a thickness of $150 \pm 30 \mu\text{m}$ (on day 15) and was composed of relatively large cells (diameter $3.92 \pm 0.79 \mu\text{m}$). These cells (U cells) contained several small vacuoles and large, swollen mitochondria, which had lost most of their cristae and exhibited weaker staining with the DiOC₆(3) dye, an indicator of mitochondrial transmembrane potential (Figure 1B). In addition, U cells contained several large lipid droplets and accumulated glycogen (Figure S1 available online). The lower (L) layer had a thickness of $200 \pm 50 \mu\text{m}$ and was composed of small cells (L cells; diameter $2.87 \pm 0.46 \mu\text{m}$). L cells usually carried a single large vacuole, one small lipid droplet and

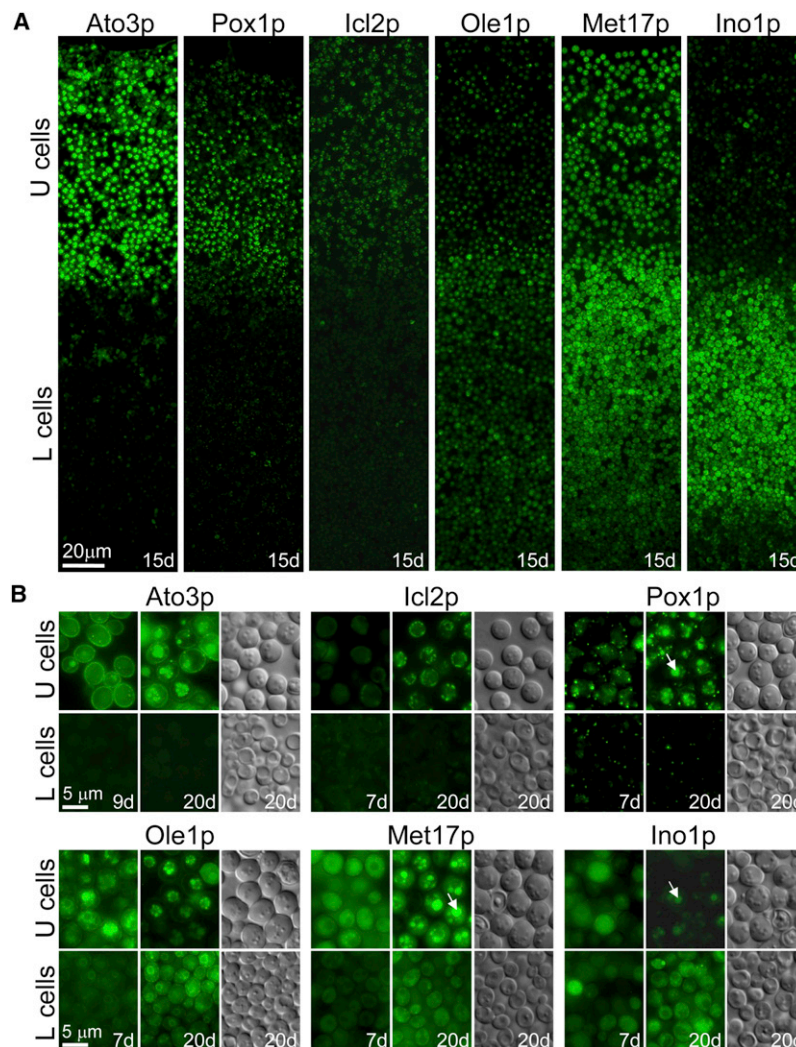


Figure 2. Location of GFP-Labeled Proteins in U and L Cells

(A) Vertical cross sections of 15-day-old colonies producing GFP-labeled proteins.

(B) Typical U and L cells in 7-day-old (9-day-old for Ato3p-GFP) and 20-day-old colonies visualized with fluorescent microscopy and Nomarski contrast. Arrows indicate GFP delivered to vacuoles by autophagy (Met17p-GFP and Ino1p-GFP) or pexophagy (Pox1p-GFP). See also Figure S2.

U and L Cells Have Different Fitness and Stress Sensitivity

U and L cells differed significantly in size and density, allowing separation by sucrose density gradient centrifugation for further characterization. Cells in fraction 1 morphologically resembled L cells, while cells in fraction 3 resembled U cells (Figure 1C). Spectrofluorometer, flow cytometer, and fluorescent microscope analyses of fractions from 15-day-old colonies producing specific GFP-labeled proteins confirmed that the vast majority of cells in fraction 1 had characteristics of L cells, while typical U cells were predominantly present in fraction 3 (Figure S2).

Once U and L cells were isolated, we analyzed their viability, sensitivity to various stresses (i.e., heat-shock and ethanol treatment), and levels of cellular reactive oxygen species (ROS). As shown in Figure 3A, L cells produced three times more ROS than U cells, and L cells were also more sensitive to stress and to treatment with zymolyase, a cell wall-degrading enzyme. Altogether, these data suggest that L cells have poorer prospects for long-term survival than U cells. Indeed, only approximately 10% of 50-day-old L cells were

able to regrow and form colonies. In contrast, colony-forming ability was preserved in approximately 50% of 50-day-old U cells (Figure 3A).

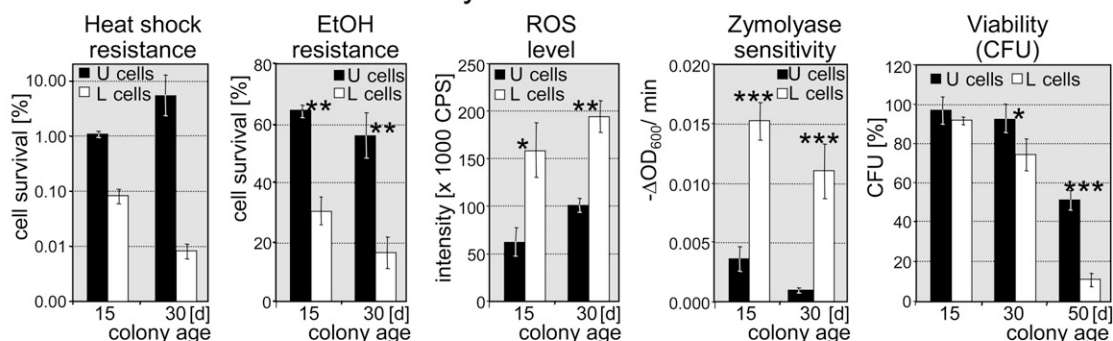
Fluorescence microscopy of colony sections formed by strains producing GFP-labeled proteins (selected based on previous expression data [Palková et al., 2002]) revealed that the protein amounts differed between cell layers. Each protein exhibited a typical localization (Figure 2A), which changed over the course of colony development (Figure 2B). Three proteins (plasma membrane Ato3p, peroxisomal Pox1p, and mitochondrial Icl2p) behaved as typical U cell proteins, which were essentially absent in the L cells of 15-day-old colonies. The production of all three proteins was enhanced in U cells at the start of colony stratification (days 7–10); however, Ato3p and Pox1p were partially degraded later. In contrast, three other proteins (cytosolic Met17p and Ino1p and the endoplasmic reticulum protein Ole1p) were produced and exhibited proper subcellular localization in the L cells of 15-day-old colonies and were gradually degraded in U cells (Figure 2B).

able to regrow and form colonies. In contrast, colony-forming ability was preserved in approximately 50% of 50-day-old U cells (Figure 3A).

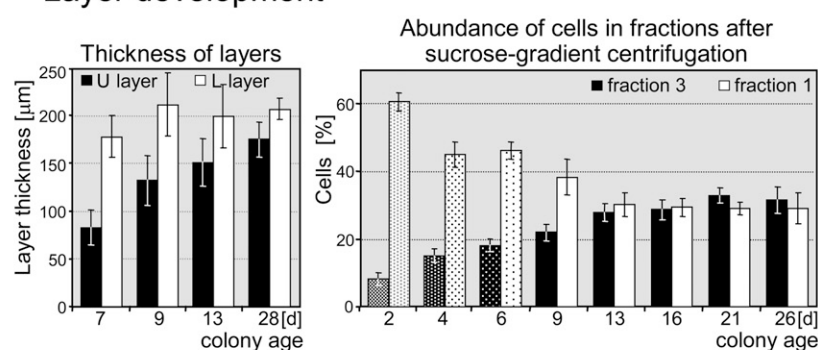
Cell Differentiation Is Not Directly Connected with Cell Division

The biomass of a colony population increases linearly during days 3–18 (Váchová and Palková, 2005). Up to day 7, a colony is composed of a rather homogeneous population of cells, and most of these cells do not have typical signs of either U or L cells. These cells look similar to those found in liquid cultivations and their size is comparable to that of L cells. Accordingly, gradient centrifugation of a 2-day-old colony separated 60% of the cells in fraction 1 and only 10% in fraction 3 (Figure 3B). Between days 7 and 10, the boundary between the U and L layers gradually became more sharply demarcated. Although the L layer did not expand after this stage, the U layer thickness continued to significantly increase (Figure 3B). The *cdc3-1* strain, which contains a thermosensitive mutation in yeast septin Cdc3p, allowed us to monitor dividing cells (reaching a typical terminal

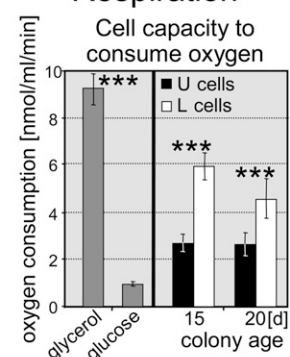
A Stress resistance and viability



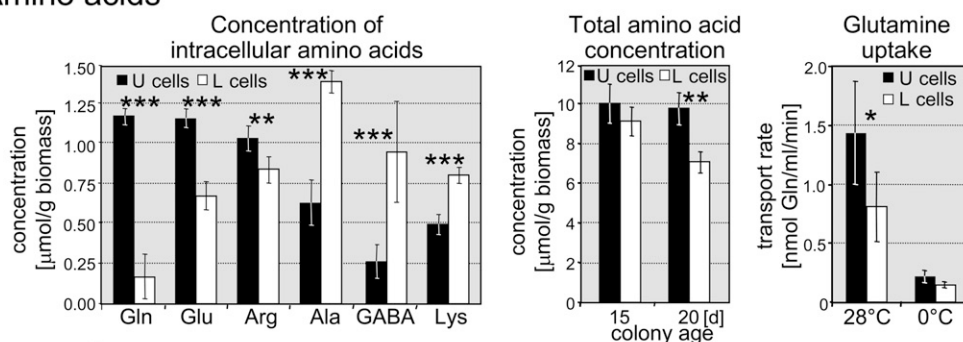
B Layer development



C Respiration



D Amino acids



E Ammonium

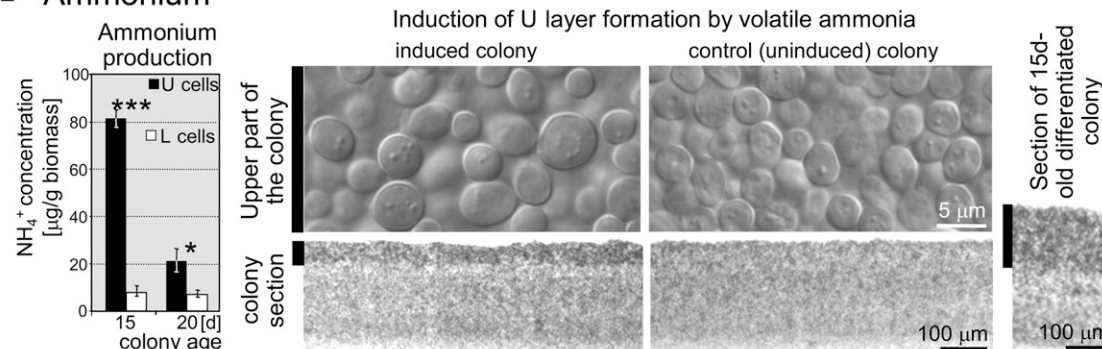


Figure 3. Properties of U and L Cells

(A) Stress-related features and viability.

(B) Development of U and L cell layers.

(C) Oxygen consumption by U and L cells. O_2 consumption by cells exponentially grown on glycerol or glucose is presented for comparison.

(D) Concentration of amino acids and glutamine uptake. Left and right: U and L cells were separated from 15-day-old colonies.

Molecular Cell

Metabolic Differentiation in Yeast Colonies

phenotype at 37°C) within colonies (Figure S3A). On day 3, intensively dividing cells were only present in the uppermost colony layer and their number gradually decreased from day 3 to 7. As the colony stratified into both the U and L layers, some dividing cells were detectable exclusively in the upper part of the U layer, but the vast majority of cells had entered the resting state.

Autophagy Is Important for U Cell Survival

The presence of remnant GFP in vacuoles of U cells producing either cytosolic (Met17p or Ino1p) or peroxisomal (Pox1p) GFP-labeled proteins (Figure 2) and the presence of free GFP on western blots (Figure 4A) suggested that autophagy and pexophagy were actively occurring in U cells. This observation was supported (1) by the measurement of vacuolar delivery and activation of Pho8Δ60p, a cytosolic variant of the Pho8p alkaline phosphatase (Noda et al., 1995) in BY-Pho8Δ60 colonies (Figure 4B) and (2) by the processing of Atg8p-GFP to GFP, as an assay of autophagosome delivery and autophagosome body lysis (Cheong and Klionsky, 2008) shown by western blots (Figure 4A). In contrast, vacuolar GFP signals were not observed in L cells (indicating low autophagic activity) or in any cell producing mitochondrial Icl2p-GFP (Figure 2), suggesting the absence of mitophagy within differentiated colonies.

The importance of autophagy was shown by analyzing autophagy-deficient colonies formed by the *atg1Δ*, *atg5Δ*, *atg8Δ*, and *atg12Δ* knockout strains. Colonies from all of these strains exhibited reduced U cell viability, particularly at later developmental phases, while L cells developed normally (Figure 4C). This result indicates that autophagy is not important for colony differentiation per se but is essential for U cell survival.

Comparison of U and L Cell Transcriptomes

To obtain an overall view of the physiological differences between U and L cells, we compared the transcriptomes of both cell types from 15- and 20-day-old colonies. The analysis revealed 345 and 235 genes with significantly higher expression in 15- and 20-day-old U cells, respectively, with 146 genes common to both time points. L cells increased expression of 360 and 366 genes in 15- and 20-day-old colonies, respectively, with 190 genes common to both time points (Figure S4). Despite differences in individual genes (Tables 1 and S1), the main U and L cell expression categories remained the same on days 15 and 20 (Figure S4). In the following sections, we primarily describe expression differences in 15-day-old colonies.

U cells predominantly expressed genes involved in translation, a spectrum of genes for metabolic enzymes and genes for nutrient and ion transporters. U cells upregulated translation machinery genes, as demonstrated by the induction of ribosomal protein genes (RPGs) (73 genes) and translation genes (13 genes; e.g., *EFT2* and *HYP2*). Aside from amino acid metabolic and transporter genes (45 and 6 genes, respectively) discussed later, U cells expressed genes involved in glycolysis (eight genes; e.g., *ENO1*, *PGK1*, and *TDH1*), the pentose-phos-

phate shunt (five genes; e.g., *GND1*, *TAL1*, and *TKL1*), nucleotide biosynthesis and transport (nine and three genes, respectively; e.g., *ADE* genes, *FCY22*, *FUN26*, and *FUR4*), vitamin biosynthesis and transport (nine and two genes, respectively; e.g., *BIO2*, *BIO3*, *THI*, genes and *SNZ1*) and peroxisomal and mitochondrial fatty acid metabolism (five genes: *ACB1*, *ETH1*, *FEN1*, *POT1*, and *SUR4*).

L cells upregulated genes involved in mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation (15 genes; Table 1), various chaperones (13 genes; e.g., *HSP10*, *HSP42*, and *SSA4*), components of the ubiquitin-proteasome system (17 genes; Table 1), vacuolar components (six genes; e.g., *PRB1* and *NVJ1*), cell wall proteins (16 genes; Table 1), and a large number of proteins of unknown function (44 genes). From the few metabolic genes induced in L cells, the largest group was involved in lipid metabolism (12 genes; e.g., *CHO1*, *SUR2*, and *PLB1*), several of which localized to lipid particles (seven genes; e.g., *PDR16*, *FAA1*, and *PIL1*). The induction of lipid metabolism in L cells was also documented by the increased fluorescence of Ole1p-GFP and Ino1p-GFP (Figure 2). In addition, L cells upregulated genes involved in the response to poor nutrient sources including the key gluconeogenic enzyme Pck1p (Figure S5), genes encoding hexose transporters (four *HXT* and two *MAL* genes), transporters of the pleiotropic drug resistance family (e.g., *SNQ2*, *PDR5*, and *PDR15*) and transporters with lipid transferase activity (*RSB1* and *PDR16*). L cells also upregulated a remarkable number of different signaling cascade components (29 genes) and transcription regulators (23 genes) (Table 1). The latter group included transcription factors involved in the stress response (*MSN2*, *MSN4*, *SKN7*, *HAA1*, *HAC1*, and *XBP1*), the ubiquitin-proteasome system (*RPN4*), multidrug resistance (*RDR1* and *CAD1*), lipid metabolism (*INO4*, *OPI1*, and *SUT1*), and nonfermentable carbon source utilization (*HAP5*, *USV1*, and *RTG1*). These results are consistent with the observed activation of relevant target genes.

The Expression of Amino Acid Metabolic and Transporter Genes Is Induced in U Cells

The striking metabolic characteristic of U cells was the upregulation of amino acid metabolic genes (45 anabolic and catabolic genes), such as genes that are involved in the biosynthesis of arginine, histidine, leucine, methionine, serine, proline, and aromatic amino acids. Amino acid catabolic genes include those for arginine degradation, branched chain and aromatic amino acid degradation via the Ehrlich pathway, and other genes (*GCV3*, *GLY1*, and *UGA2*). Together with amino acid metabolic genes, genes for amino acid transporters (*GNP1*, *BAP2*, *TAT1*, *UGA4*, and *DUR3*) and mitochondrial carriers that transport amino acid intermediates (*YMC2*, *ODC2*, and *ORT1*) were also induced. Overall, the observed expression pattern indicated a high turnover and synthesis of amino acids in U cells. In contrast, only a few amino acid metabolic and transporter genes were upregulated in L cells; however, key biosynthetic genes (*GLN1* for

(E) Ammonium excreted from U and L cells (left). Induction of U layer formation in a 4-day-old colony evoked by ammonia produced by older adjacent colonies (right). The black bar marks the U cell layer.

The mean is shown \pm SD ($n = 3$ for A, B, C, and E; $n = 4$ for D); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. See also Figure S3 and the Supplemental Experimental Procedures.

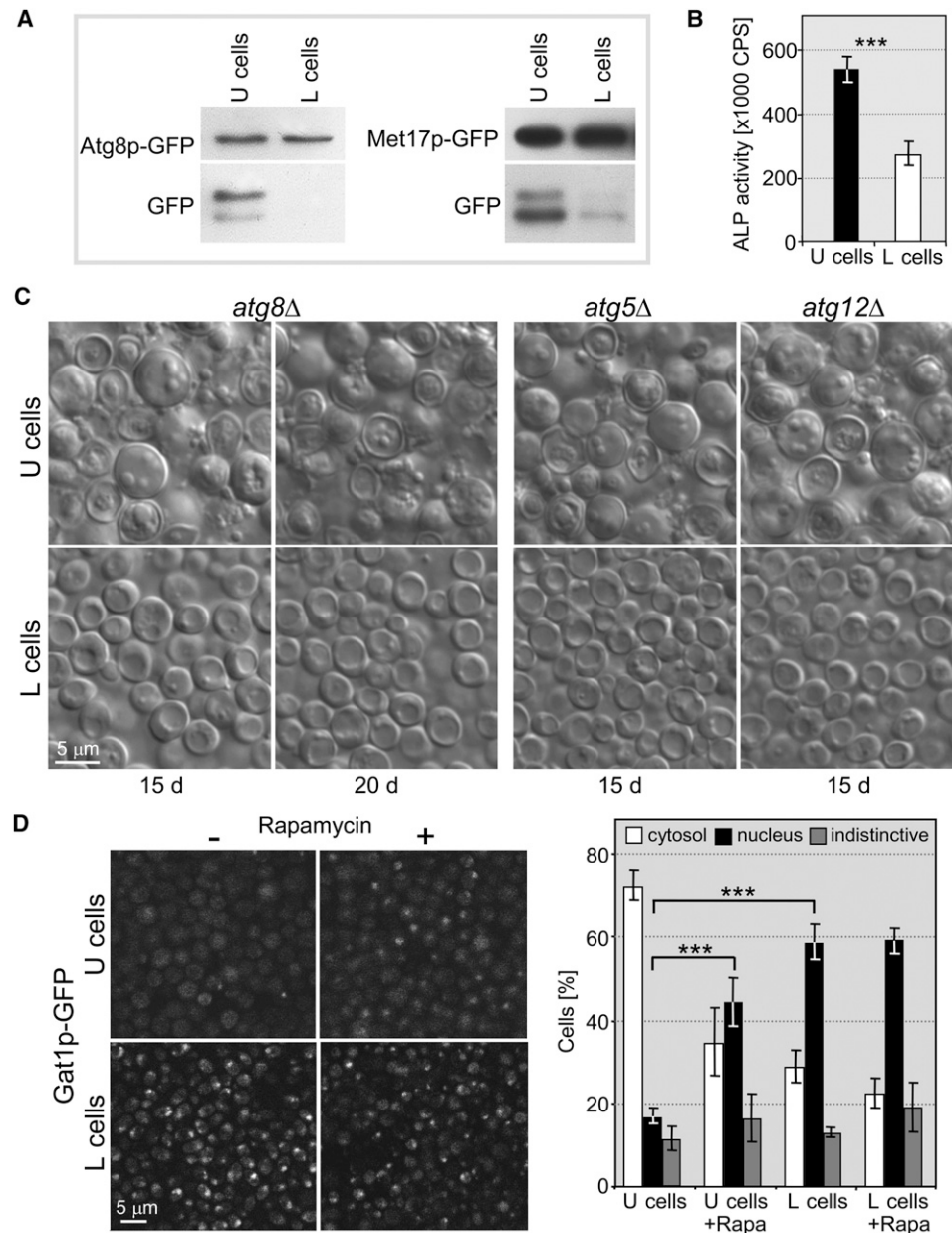


Figure 4. Autophagy and TOR Activity in U and L Cells from 15-Day-Old Colonies

(A) Atg8p-GFP, Met17p-GFP, and free GFP.

(B) Activity of Pho8Δ60p.

(C) Morphology of cells localized in the upper and lower regions of colonies formed from autophagy-defective knockout strains.

(D). Gat1p-GFP localization in U and L cells and the effect of rapamycin treatment. Confocal microscopy images of colony cross-sections (left) and TOR kinase activity assessed as the proportion of cytoplasmic and nuclear localization of Gat1p-GFP (right).

The mean is shown \pm SD (n = 4); ***p < 0.001.

glutamine synthetase and *GDH3* for glutamate dehydrogenase) were among them.

Amino Acid Concentration and Ammonium Export in U and L Cells

To better understand amino acid homeostasis, we investigated the amount of intracellular amino acids in U and L cells. Although

the total amino acid content was similar in both cell types in 15-day-old colonies, the amino acid composition was markedly different (Figure 3D). The most prominent difference was the level of glutamine, which was the most abundant amino acid in U cells but was low in L cells (approximately 12%–15% of the U cell concentration). The levels of glutamate and arginine were also slightly higher in U cells compared with L cells. In

Table 1. Selected Genes Differentially Expressed in U and L Cells

	U Cells	L Cells
Mitochondria: Chaperones		BCS1, HSP60, HSP78, MDJ1, PHB1, PHB2, CCS1 , HSP10 , NBP35 , TIM9 , <i>ARH1</i> , <i>ISA2</i>
Mitochondria: Ribosome		MRP20, MRPL28, MRPS12, MRPL10 , MRPL39 , MRPL51 , MRPS18 , RSM18 , RSM19 , <i>MRP2</i> , <i>MRPL16</i> , <i>MRPL19</i>
Mitochondria: Respiration		COX6, CYB2, NDI1, QRI5, TIM11, ATP18 , COX11 , COX13 , COX14 , COX19 , CYC7 , MSS51 , OLI1 , QCR9 , QCR10 , <i>ATP6</i> , <i>COA1</i> , <i>COX1</i> , <i>COX2</i> , <i>CYT2</i> , <i>QCR6</i>
Mitochondria: Metabolism	ADK1, ALD5, DLD2, ILV5, MAE1, ODC2, ORT1, YMC2, ABC1 , ARG5 , ARG6 , ARG8 , BAT1 , BIO2 , ECM40 , FOL1 , GCV3 , ILV1 , LEU4 , MET13 , THI4 , <i>CAT2</i> , <i>LYS12</i> , <i>YAT2</i>	GDH3, GLN1, PUT1, PYK2, CHO1 , CLD1 , FAA1 , <i>UPS2</i>
Mitochondria: Other	ABC1, ABF2, AIM41, AIM45, MDM30, PET9, PET18, PET122, YLR290C, YLR346C, YPR098C , <i>ATP20</i> , <i>GDS1</i> , <i>JAC1</i> , <i>MSC1</i> , <i>SPG1</i>	CBP6, FIS1, FMP37, FMP45, PET494, RTC2, SUE1, ZRG8, AIM46 , FMP10 , FMP43 , FZO1 , MHR1 , MSS116 , OM45 , SOM1 , UPS1 , YME1 , YNL213C , ZEO1 , <i>AEP3</i> , <i>AIF1</i> , <i>AIM17</i> , <i>AIM42</i> , <i>MGM1</i> , <i>MDM35</i> , <i>RSF1</i> , <i>UPS2</i> , <i>YNL211C</i>
Translation ^a	48 genes, 38 genes , 37 genes	5 genes, 2 genes , 1 gene
Other metabolism ^a	49 genes, 27 genes , 18 genes	12 genes, 10 genes , 9 genes
Transport	BAP2, ENA1, FCY22, FUN26, FUR4, GNP1, ODC2, ORT1, PDR12, PET9, PMA1, SMF3, TAT1, TPN1, UGA4, YLR046C, YMC2, ZRT1, ATO3 , AQY1 , AVT7 , DUR3 , PHO91 , PMA2 , SUL2 , TFP1 , VHT1 , <i>TAT2</i>	AGP2, ENB1, HXT4, HXT6, MAL11, MAL31, PDR15, PMC1, YLR346C, ADY2 , AVT6 , HXT3 , HXT7 , ITR1 , MEP3 , PDR5 , PDR16 , RSB1 , SNQ2 , TPO4 , <i>ARN2</i> , <i>ATX1</i> , <i>CRC1</i> , <i>FTH1</i> , <i>MEP2</i> , <i>MNR2</i> , <i>MUP3</i> , <i>NRT1</i> , <i>PHO84</i>
Degradation	UBP2, SSM4 , UBC1 , UBP5 , <i>CIS1</i> , <i>MMS2</i> , <i>UBA1</i>	CUE4, NVJ1, RMD5, RPN5, RPN10, SLM4, STS1, UBC7, UBC11, UMP1, VPS27, VPS62, ATG8 , ATG21 , HRT3 , PRB1 , RPN11 , RPN13 , RPT6 , SEM1 , SHP1 , UFD1 , UBC8 , <i>ATG11</i> , <i>CDC34</i> , <i>HSV2</i> , <i>PRE8</i> , <i>PUP2</i> , <i>RAD6</i> , <i>RPT2</i> , <i>RPT4</i> , <i>SAF1</i> , <i>SCL1</i> , <i>SLX8</i> , <i>UBS1</i> , <i>UFO1</i> , <i>VID27</i>
Cell wall	ECM15, YLR194C, ZPS1, HKR1 , FKS1 , ROT2 , <i>PST1</i> , <i>YPS3</i>	CCW12, DSE4, NAB6, SHE10, YAR066W, YBR071W, ASP3 , CTS1 , CWP1 , EGT2 , FIT2 , FIT3 , SCW11 , SPI1 , TIP1 , UTR2 , <i>CWC27</i> , <i>HLR1</i> , <i>LRE1</i> , <i>OSW2</i> , <i>PAU6</i> , <i>PAU8</i> , <i>PAU10</i> , <i>PAU18</i>
Regulation: Signal transduction	ASC1, MGA2, NAT5, NPR2, PPS1, CMD1 , IRA2 , LTP1 , PTC4 , <i>GIP3</i> , <i>HKR1</i> , <i>SNF1</i>	AVO2, CSR2, FPK1, GAL83, GIP2, KIN82, KSP1, PIG2, REG2, RTS1, SAC7, SHP1, SIP2, SSD1, STD1, TIP41, VHS1, VHS3, CMK2 , ECM3 , FRQ1 , GPA2 , MIH1 , OPY2 , RCK1 , RGS2 , SAT4 , YNL234W , ZEO1 , <i>CCL1</i> , <i>HLR1</i> , <i>ISR1</i> , <i>LRE1</i> , <i>PLC1</i> , <i>SCS2</i> , <i>HSV2</i> , <i>SAF1</i> , <i>SCH9</i> , <i>SLG1</i> , <i>SRC1</i> , <i>UME1</i>
Regulation: Transcription factors	CUP9, RAP1, STB4, WTM1, LEU3 , STE12 , <i>CRF1</i> , <i>GCR1</i>	CAD1, HAA1, HAC1, MSN2, RDR1, USV1, VHR1, XBP1, BUR6 , HAP5 , INO4 , MCM1 , MIG1 , MIG2 , MSN4 , MTH1 , OPI1 , PHD1 , RPN4 , RTG1 , SKN7 , SUT1 , YAP5 , <i>CIN5</i> , <i>CUP2</i> , <i>SFL1</i> , <i>STP1</i> , <i>YAP1</i>

Genes upregulated in 15-day-old colonies are in normal font, genes upregulated in 20-day-old colonies are in italics, and genes common to both time points are in bold. The genes are sorted according to their predominant function. See also Figure S4 and Table S1.

^aGenes are discussed in the text and listed in the Table S1.

contrast, the most abundant amino acids in L cells were GABA, alanine, and lysine. Amino acids were also present in the extracellular fluid of the colony, and both cell types were able to release amino acids into their surroundings when incubated in buffer (Figure S3B). Moreover, U cells import glutamine more efficiently than L cells (Figure 3D), which is consistent with the high expression observed for *GNP1* (glutamine transporter). To detect the presence of extracellular amino acids in the colonies in situ, we stained colony cross-sections with ninhydrin. As

shown in Figure S3B, the L layer contained more extracellular amino acids than the U layer.

Amino acid availability and transport are tightly linked to the ammonia signaling capability of the colony (Zikánová et al., 2002). Measuring the ability of the two cell types to export ammonium into the buffer revealed a notable difference. While U cells exported substantial levels of ammonium, almost no ammonium was detected in the buffer after L cell incubation (Figure 3E). In addition, exposure of young undifferentiated colonies

(i.e., colonies that have not yet reached the ammonia-producing phase) to volatile ammonia, coming through the air, led to premature ammonia production in the young colony (Rídicová et al., 2007) and subsequently to the premature formation of the U layer (Figure 3E). This result thus demonstrates that ammonia signaling is important for the induction of U layer formation.

L Cells Are the Respiratory Active Subpopulation

Electron and fluorescence microscopy of U and L cells revealed remarkable differences in mitochondrial morphology (see above). Correspondingly, transcriptome data revealed differences in mitochondrial protein gene expression (Table 1). L cells upregulated a group of genes for mitochondrial ribosomes (nine genes); genes for proteins involved in oxidative phosphorylation (15 genes), mitochondrial fission, and fusion (*FZO1* and *FIS1*); genes for various chaperones and other proteins involved in the transport and maturation of mitochondrial proteins (ten genes); and genes for mitochondrial proteins with unknown function (ten genes).

These data imply different respiration capabilities in L and U cells. Therefore, we tested the oxygen consumption rate in cells separated from colonies. L cells exhibited significantly higher respiration rates than U cells (Figure 3C). Thus, L cells consumed approximately 50%–65% of oxygen compared to fresh respiring cells, while U cells were more similar to fresh fermenting cells.

Different Nutrient-Sensing Pathways Are Active in U and L Cells

Based on transcription data, we attempted to identify regulators and signaling pathways that could control gene expression in U and L cells (Figure S5). U cells are characterized by high expression of translation machinery genes, which are known to be upregulated by nutrient availability sensed by the TOR and PKA pathways (Smets et al., 2010). Upregulation of genes encoding amino acid permeases also implies a role for the SPS sensor, which responds to extracellular amino acids (Hundal and Taylor, 2009). However, some U cell expression characteristics appear to contradict the predicted metabolically active state. For example, the activation of amino acid and purine biosynthetic genes suggests regulation through the Gcn4p transcription factor, which is active under conditions of limited amino acids.

In contrast to U cells, L cells upregulate the transcription of many starvation- and stress-responsive genes (Figure S5), including (1) genes repressed by the Mig1p transcription factor when glucose levels are high, (2) a group of heat-shock transcription factor Hsf1p-responsive genes, and (3) genes involved in the utilization of nonfermentable carbon sources, which are induced by the transcription factors Adr1p and Cat8p. All of these transcription factors are under the control of another nutrient-sensing protein kinase, Snf1p. High Snf1p activity implies low PKA and TOR activity in L cells. Consistent with this implication, the derepression of genes involved in mitochondrial respiration, proteasomal, and vacuolar degradation and utilization of poor nitrogen sources in L cells were observed. In addition, many components of the Snf1p pathway were among

the genes specifically expressed in L cells (*GAL83*, *GIP2*, *MTH1*, *PIG2*, *REG2*, *SHP1*, *SIP2*, and *STD1*).

To assay TOR activity in the colonies, we tracked the subcellular location of a GFP-labeled variant of the TOR-responsive transcription factor Gat1p (Figure 4D). This protein is cytosolic in active TOR kinase conditions and moves to the nucleus upon TOR kinase inactivation (Tate et al., 2010). As expected, a predominant nuclear localization of Gat1p-GFP was observed in the L cells, while a majority of the U cells exhibited cytosolic localization. Importantly, the TOR-inactivating drug rapamycin induced Gat1p-GFP relocalization to the nucleus in U cells.

Genetic Determinants of Colony Development

To evaluate the importance of predicted metabolic processes, transporters, and regulators in colony differentiation, we analyzed colonies formed by selected knockout strains. Impacted colonies formed by viable knockout strains fell into three main groups according to the type of colony injury (Figure 5). The first group included strains forming colonies that normally differentiated into U and L cells; however, U cells exhibited significantly reduced viability, which was distinguished as disrupted U cells on colony cross-sections, compared to wild-type U cells. Autophagy genes (see above), genes involved in glycolysis (*PFK2*), gluconeogenesis (*PCK1*), amino acid metabolism (*GLT1*), and hexose (*HXT3*, *HXT4*) and glutamine (*GNP1*) transport fell into this category (Figure 5). The second group contained strains with defects in respiratory metabolism (*coa1Δ*, *ndi1Δ*, and *sdh1Δ*) and a strain lacking Cat8p, a regulator of carbon source responsive genes. These strains formed colonies with less prominent cell morphological diversification that were composed of larger, less vacuolated L cells and less viable U cells. Flow cytometry cell separation and gating according to wild-type U and L cell size revealed that from day 7, the ratio of U- to L-gated cells was significantly higher in these defective colonies than in wild-type colonies (Figure 5B). In addition, the percentage of propidium iodide-positive L-gated cells and/or cellular debris gradually increased with time. Taken together, it seems that nutrient transport and glucose and amino acid metabolism are important for U cell longevity, whereas the capacity for respiratory metabolism is important for typical L cell development. These data also suggest that L cell formation and functional L cell metabolism are important for U cell longevity.

The third group includes four knockout strains defective in the pleiotropic regulators Sok2p and Gcn2p, Ira2p, a negative regulator of the PKA pathway, and Yak1p kinase, which is negatively regulated by PKA. These strains formed colonies with fewer differences between the U and L cells and with decreased overall viability (more pronounced in U cells), as evidenced by disrupted cells observed by microscopy and propidium iodide (PI)-positive cells and cellular debris as detected by flow cytometry. Thus, these regulatory proteins seem to be involved since the early stages of colony diversification, and their defects have pleiotropic effects on subsequent U and L cell formation and viability.

DISCUSSION

By approximately day 10, *S. cerevisiae* colonies are fully differentiated, i.e., composed of cells with distinct physiologies and

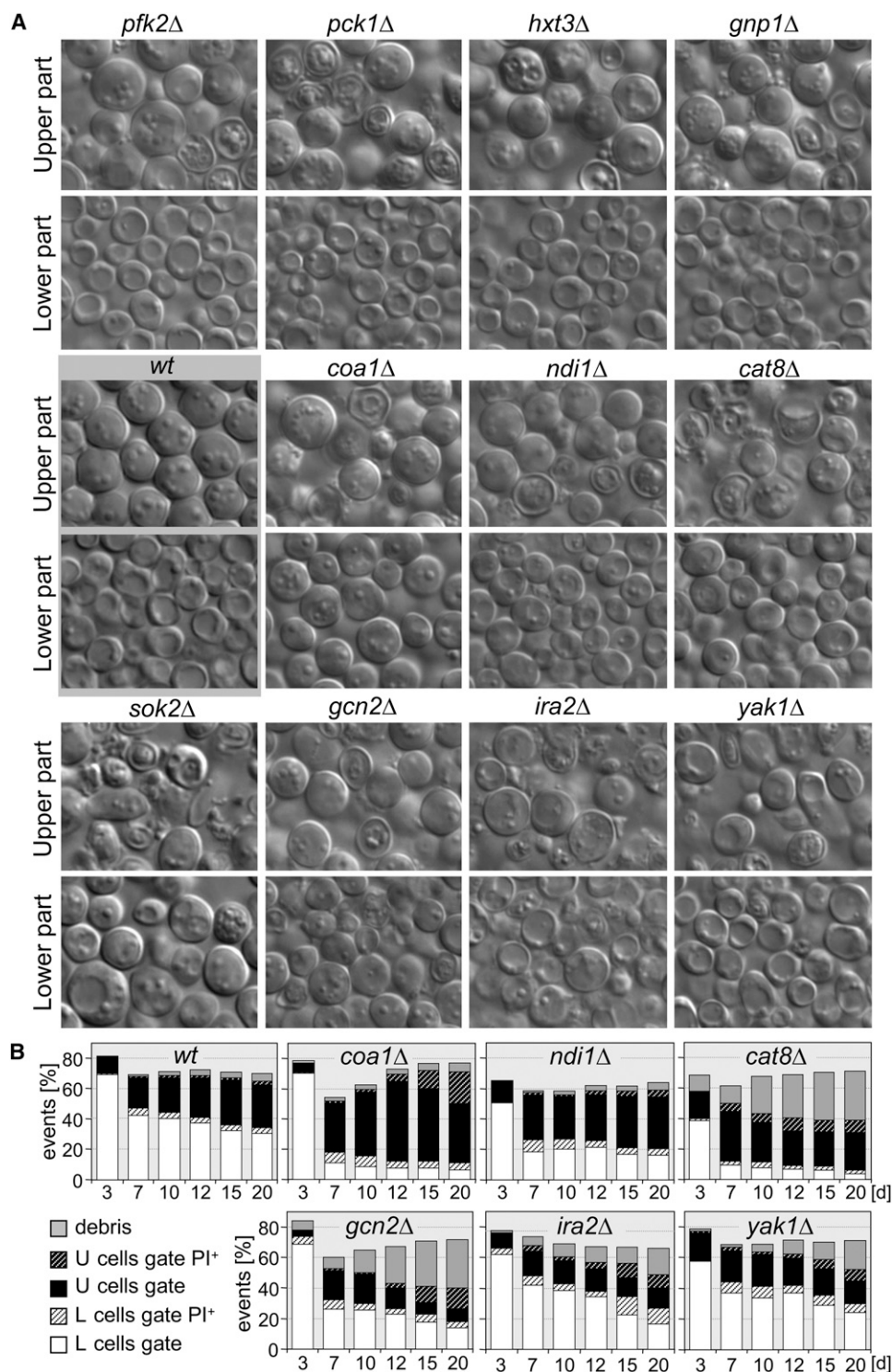


Figure 5. Alterations in Cell Morphology and Composition of Colonies Formed from Different Knockout Strains

(A) Morphology of cells located in the upper and lower colony regions. Cells in the central sections of 15-day-old colonies were visualized with Nomarski contrast. Typical U and L cells from a parental strain colony (wt) are presented for comparison.

(B) Flow cytometry analysis of colony cell composition. PI⁺ and PI⁻, propidium iodide-positive and -negative cells, respectively.

morphologies that are localized to particular positions within the colony. Excluding cells that form the colony margin and exhibit specific properties, as described elsewhere (Váchová et al., 2009b), the central part of the colony is composed of two major cell layers: the upper U and lower L layer. U and L cells differentiate from preexisting, uniform, and primarily non dividing cells through significant changes in their properties according to their spatial location. Triggers for colony stratification are currently unknown; however, similarly to the center-margin colony diversification scheme (Čáp et al., 2009; Váchová and Palková, 2005), ammonia signaling appears to be important for the vertical stratification of the center of the colony. This hypothesis is supported from findings that (1) the timing of fully developed vertical stratification correlates with the colony transition to the ammonia-producing phase (day 10), (2) volatile ammonia treatment prematurely induces formation of the U cell layer in young undifferentiated colonies, (3) some U cell characteristics resemble those activated by ammonia signaling (Palková et al., 2002), and (4) *sok2Δ* colonies defective in ammonia signaling (Váchová et al., 2004) fail to undergo typical vertical stratification.

Previously, Allen et al. (2006) had isolated two morphologically distinct cell types from an aged yeast liquid culture, which were characterized as quiescent and nonquiescent cells. Although there are some similarities between quiescent cells and U cells, such as the accumulation of glycogen, low ROS levels and high thermotolerance, these two cell types do not harbor other typical characteristics of colony U and L cells, particularly not those related to differences in metabolism and mitochondria. For example, quiescent cells were highly active in respiration (Davidson et al., 2011), while U cells significantly decreased respiration when compared with L cells or fresh respiring cells. This result is consistent with previous findings showing that the physiology of yeast in colonies is different from that in liquid cultures (Čáp et al., 2009).

What then are the functions of both cell types within colonies? On the one hand, U cells behave similarly to metabolically active cells that possess biosynthetic capacity controlled by nutrient sensing pathways (e.g., TOR and PKA). On the other hand, U cells also exhibit several prominent metabolic characteristics typical of starving cells (i.e., activation of GCN and autophagic pathways and glycogen accumulation). In addition, U cells reduce respiration, contain large, swollen mitochondria, and downregulate the expression of mitochondrial genes. What is the evidence for and against the involvement and importance of particular nutrient-sensing mechanisms? The prediction of an active TOR pathway in U cells is strongly supported by the rapamycin-sensitive cytosolic localization of the TOR-responsive transcription factor Gat1p and by the presence of high levels of glutamine, a potent TOR pathway activator (Smets et al., 2010) in U cells. In contrast to studies reporting yeast cell longevity related to inhibition of the TOR pathway and increased mitochondrial oxidative phosphorylation (Pan and Shadel, 2009), activation of several TOR-dependent functions appears to be advantageous for cell longevity in colonies when combined with lower mitochondrial respiration. On the other hand, PKA hyperactivation via deletion of *IRA2* or the PKA-inactivated kinase *YAK1* affects colony differentiation and U cell survival. These data suggest that the TOR pathway is induced in parallel with

the inactive PKA pathway in U cells. This combination of signaling events could explain autophagy induction and glycogen accumulation because both were shown to increase under conditions in which TOR is active and PKA is inactive (Soulard et al., 2010; Yang et al., 2010). The modulation of amino acid metabolism and transport is another striking U cell characteristic, which is documented at the transcription, protein, and amino acid concentration levels. Two pathways, SPS and GCN, can be involved in balancing intracellular/extracellular amino acid homeostasis. The SPS sensor primarily triggers the capacity of the cell to import amino acids present in the surroundings. This requirement is met in colonies, as the extracellular fluid harvested from colonies contains amino acids and the knockout of one of SPS-activated gene (*GNP1*) decreases the longevity of U cells. The majority of amino acid metabolic genes expressed in U cells are under the positive control of the Gcn4p transcription regulator (Natarajan et al., 2001), which is mainly stimulated at the translation level by the Gcn2p protein kinase pathway in response to amino acid starvation. Gcn2p is activated under conditions in which uncharged transfer RNAs begin to accumulate and its activity can further increase upon release from inhibitory TOR phosphorylation (Cherkasova and Hinnebusch, 2003; Natarajan et al., 2001), implying an interplay between the TOR and GCN pathways in sensing amino acid availability. Thus, Gcn2p can be partially activated by depriving yeast of a single amino acid even under conditions when other amino acids are plentiful and TOR is active. Because the *GCN2* knockout has a pleiotropic effect on both U and L cells, the simple evaluation of the role of the GCN pathway is rather difficult.

In summary, U cells appear to have unique metabolic properties that are optimal for their long-term existence within the colony. These properties are due to the concerted action of reduced mitochondrial function and metabolic reprogramming, which is likely guided by several nutrient-sensing mechanisms. The beneficial effect of such reprogramming is clearly supported by the finding that U cells are free of intracellular ROS, highly resistant to various types of stress and maintain their viability over a long period of time. U cells are even capable of slow division until day 20, which was shown by the increased U layer thickness as the colony aged.

In contrast to U cells, L cells behave similarly to starving cells, showing signs of SNF pathway activation, derepression of glucose-repressed genes and respiratory-active mitochondria. The importance of these last two characteristics in the formation of typical L cells is supported by data from *cat8Δ*, *coa1Δ*, and *ndi1Δ* colonies. Interestingly, the fact that L cells possess active mitochondria appears to contradict the location of L cells in the lower part of the colony, which is believed to be a hypoxic environment (Peters et al., 1987). However, recent results have shown that under slow-growth conditions, a certain level of hypoxia could cause the upregulation of respiration genes (Rintala et al., 2009). Thus, although isolated L cells consume oxygen quite effectively, their actual respiratory status within colonies remains to be elucidated. Consistent with the above characteristics, L cells produce a higher level of ROS and are generally less viable than U cells. Although they are closer to the medium and thus have better access to nutrients

than U cells, L cells do not grow. This phenomenon implies the involvement of signaling mechanism(s) that block growth in the L layer and maintain slow growth in the U layer. Such mechanism(s) could involve signal metabolites such as ammonia (Palková et al., 1997) and fusel alcohols (Dickinson, 1996), accumulated metabolic waste products or low gas exchange (Peters et al., 1987).

The U cell features imply that these cells somehow gain a sufficient amount of nutrients to drive metabolism and cell growth in colonies that are 10–20 days old and grow on a nonfermentable carbon source. Our findings indicate that L cells could be the source. First, transcription data suggest that L cells activate various degradative mechanisms, which could produce low molecular weight compounds from intracellular proteins and lipids. Second, L cells upregulated genes encoding enzymes that are involved in the synthesis of key nutrients (e.g., glucose and glutamine) and genes encoding various transporters (e.g., hexose transporters), which were shown to export glucose out of the cell under some circumstances (Jansen et al., 2002). Importantly, defects in these genes significantly decreased U cell viability. In addition, L cells released amino acids (as shown by ninhydrin staining) and decreased their total intracellular amino acid concentration by 23% between days 15 and 20. Third, the cell wall, when degraded, also represents another rich sugar source. L cells upregulated genes for several cell wall glucanases (Scw11p, Dse4p, Egt2p) that may release cell wall components and cause weakening of the cell wall in L cells. Taken together, these findings lead us to hypothesize that L cells release amino acids (including glutamine, which is present in the colony extracellular fluid) and other compounds (possibly sugars) to feed U cells. This potential nutrient release from L cells also agrees with the observation that the center of the colony is important for cell growth at the margin (Váchová and Palková, 2005). High ROS levels could trigger regulated cell death in some L cells (Čáp et al., 2009; Váchová and Palková, 2005), and the released compounds could become another nutrient source for U cells. However, to feed U cells, L cells should not reutilize the released compounds. This precondition can be ensured by the metabolic differences between U and L cells regulated by nutrient-sensing pathways as described above.

The assumption that glutamine is one of the major players in the regulation of distinct metabolisms of U cells led us to draw intriguing parallels between U and L yeast cells and tumor and healthy mammalian cells, respectively (Figure 6). These parallels are supported by the fact that alterations in mitochondria morphology, including mitochondrial swelling and partial/total cristolysis, were frequently observed in tumor cells (Arismendi-Morillo and Castellano-Ramirez, 2008). In a variety of tumors, glutamine and glucose represent major nutrient sources consumed by tumor cells via aerobic glycolysis and the TCA cycle, resulting in the production of ammonium, lactate and alanine (DeBerardinis and Cheng, 2010). Lactate and alanine are recycled by liver cells back into glucose through the Cori cycle and ammonium is converted to glutamine by muscle cells through the glutamine- NH_4^+ cycle (Figure 6), providing energy for tumor growth. This type of metabolism results in cachexia, i.e., a progressive loss of muscle and adipose tissue mass that may be triggered by the tumor and, in some cases, is directly

attributed to glutamine depletion (Hundal and Taylor, 2009). Ammonia produced by glutaminolysis was recently described as a signaling molecule that induces autophagy in tumor cells (Eng et al., 2010). In summary, the finding that ammonia is produced specifically by U cells that display active autophagy, high glutamine levels in the extracellular fluid of colonies, proteolysis in L cells and other similarities between U cells and tumor cells (i.e., mitochondrial physiology, lowered respiration, TOR, and amino acid metabolism activation) point to unexpected metabolic similarities between a differentiated yeast colony and a tumor-affected organism.

S. cerevisiae cells have already been suggested for use as a tool for screening antitumor agents (Díaz-Ruiz et al., 2009). The yeast colony with multicellular complexity and unique features described here represents a valuable model to study the processes and regulation involved in the interplay between metabolically different cell subpopulations. Our data indicate that both U cells and tumor cells may switch to an evolutionarily conserved metabolic program and exploit other cells within their community/organism. Thus, studying this behavior and its regulation in a yeast colony model may uncover several new aspects of tumor biology.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Strains and Media

The *S. cerevisiae* strain BY4742 (MAT α , *his3* Δ , *leu2* Δ , *lys2* Δ , and *ura3* Δ) and all isogenic knockout strains were from the EUROSCARF collection. Strain 104D7 with the thermosensitive *cdc3-1* allele was from the DMUP collection (Faculty of Science UK, Prague, Czech Republic). Strains containing C-terminal GFP fusion proteins and BY-Pho8 Δ 60 strain were prepared as described in the Supplemental Experimental Procedures. Yeast giant colonies were grown (six per plate) at 28°C on GMA (1% yeast extract, 3% glycerol, 1% ethanol, 2% agar, 10 mM CaCl_2).

Fluorescent Dye Staining and Microscopy

Vacuoles were pulse-chase stained with 40 μM FM4-64 (Sigma) and lipid droplets with 3 μM Nile Red (Sigma). Mitochondria were visualized using 100 nM DiOC $_6$ (3) mitochondrial dye (Molecular Probes). Fluorescent cell samples were observed under a Leica DMR fluorescent microscope using a GFP [GFP and DiOC $_6$ (3)] and A filter (Nile Red).

Intact yeast colonies were embedded in 2% agarose gel (Sigma, Type I-B) and sectioned using a Leica VT1200S vibrating microtome. Sections (8 μm) from the central colony part were examined by light and fluorescence microscopy. Smaller blocks were cut from the central part of the embedded colony and processed for confocal or electron microscopic observation (see details in the Supplemental Experimental Procedures).

Sucrose Gradient Cell Fractionation

Cells from colonies were fractionated into subpopulations by centrifugation (Egilemez et al., 1990). A linear 10%–35% sucrose gradient (50 ml) was overlaid with colony cell suspension and centrifuged for 5 min at 180 g. Three fractions of 6 ml each were collected from the top of the gradient and used for subsequent analyses. Fraction 1 comprised the smallest cells with the lowest density (L cells), and fraction 3 consisted of the largest and most dense cells (U cells). Fraction 2 contained a mixture of U and L cells and was not analyzed further.

Cell Resistance

Cell survival was assayed using 10-fold serial dilutions of cell suspensions ($\text{OD}_{600} = 10$) that were incubated at 52°C for 90 min or in 20% ethanol for 60 min and compared to untreated controls. Zymolyase resistance was determined as the decrease in OD_{600} of a cell suspension (starting $\text{OD}_{600} = 0.5$)



(B) Tumor cells obtain energy for growth primarily through glycolysis and glutaminolysis. Metabolic waste products are then reused by liver (alanine and lactate) and muscle cells (ammonium) to produce more glucose and glutamine, which can then be reused to the tumor cells. Metabolic cycles in tumor cells and their proposed yeast colony analogs are indicated with green arrows (Cori cycle) and blue arrows (glutamine-ammonia/um cycle). Solid black arrows indicate a metabolic process or transport, dotted red arrows indicate activation and dotted green lines indicate repression. Processes or enzymes in red are induced and those in green are repressed in the particular cell type. AAT, amino acid transporters; GCN, Gcn4 pathway; HXT, hexose transporters; MT, mitochondrion; OXPHOS, oxidative phosphorylation; SPS, SPS sensor; SNF, Snf1p pathway; TCA, tricarboxylic acid cycle.

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (204/08/0718), the Ministry of Education (LC531 and MSM0021620858).

RVO 61388971, and the Howard Hughes Medical Institute International Research Award (55005623) to Z.P.

Received: March 7, 2011

Revised: December 16, 2011

Accepted: March 23, 2012

Published online: May 3, 2012

REFERENCES

- Allen, C., Büttner, S., Aragon, A.D., Thomas, J.A., Meirelles, O., Jaetao, J.E., Benn, D., Ruby, S.W., Veenhuis, M., Madeo, F., and Werner-Washburne, M. (2006). Isolation of quiescent and nonquiescent cells from yeast stationary-phase cultures. *J. Cell Biol.* 174, 89–100.
- Arismendi-Morillo, G.J., and Castellano-Ramirez, A.V. (2008). Ultrastructural mitochondrial pathology in human astrocytic tumors: potentials implications pro-therapeutics strategies. *J. Electron Microsc.* (Tokyo) 57, 33–39.
- Čáp, M., Váchová, L., and Palková, Z. (2009). Yeast colony survival depends on metabolic adaptation and cell differentiation rather than on stress defense. *J. Biol. Chem.* 284, 32572–32581.
- Chen, H., and Fink, G.R. (2006). Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev.* 20, 1150–1161.
- Cheong, H., and Klionsky, D.J. (2008). Biochemical methods to monitor autophagy-related processes in yeast. *Methods Enzymol.* 451, 1–26.
- Cherkasova, V.A., and Hinnebusch, A.G. (2003). Translational control by TOR and TAP42 through dephosphorylation of eIF2 α kinase GCN2. *Genes Dev.* 17, 859–872.
- Davidson, G.S., Joe, R.M., Roy, S., Meirelles, O., Allen, C.P., Wilson, M.R., Tapia, P.H., Manzanilla, E.E., Dodson, A.E., Chakraborty, S., et al. (2011). The proteomics of quiescent and nonquiescent cell differentiation in yeast stationary-phase cultures. *Mol. Biol. Cell* 22, 988–998.
- DeBerardinis, R.J., and Cheng, T. (2010). Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* 29, 313–324.
- Díaz-Ruiz, R., Uribe-Carvajal, S., Devin, A., and Rigoulet, M. (2009). Tumor cell energy metabolism and its common features with yeast metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1796, 252–265.
- Dickinson, J.R. (1996). 'Fusel' alcohols induce hyphal-like extensions and pseudohyphal formation in yeasts. *Microbiology* 142, 1391–1397.
- Egilmez, N.K., Chen, J.B., and Jazwinski, S.M. (1990). Preparation and partial characterization of old yeast cells. *J. Gerontol.* 45, B9–B17.
- Eng, C.H., Yu, K., Lucas, J., White, E., and Abraham, R.T. (2010). Ammonia derived from glutaminolysis is a diffusible regulator of autophagy. *Sci. Signal.* 3, ra31.
- Engelberg, D., Mimran, A., Martinetto, H., Otto, J., Simchen, G., Karin, M., and Fink, G.R. (1998). Multicellular stalk-like structures in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 180, 3992–3996.
- Hundal, H.S., and Taylor, P.M. (2009). Amino acid transceptors: gate keepers of nutrient exchange and regulators of nutrient signaling. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E603–E613.
- Jansen, M.L., De Winder, J.H., and Pronk, J.T. (2002). Hxt-carrier-mediated glucose efflux upon exposure of *Saccharomyces cerevisiae* to excess maltose. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4259–4265.
- Lindroth, P., and Mopper, K. (1979). High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde. *Anal. Chem.* 51, 1667–1674.
- Mináriková, L., Kuthan, M., Ricicová, M., Forstová, J., and Palková, Z. (2001). Differentiated gene expression in cells within yeast colonies. *Exp. Cell Res.* 271, 296–304.
- Natarajan, K., Meyer, M.R., Jackson, B.M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A.G., and Marton, M.J. (2001). Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol. Cell Biol.* 21, 4347–4368.
- Noda, T., Matsuura, A., Wada, Y., and Ohsumi, Y. (1995). Novel system for monitoring autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210, 126–132.
- Ohkuni, K., Hayashi, M., and Yamashita, I. (1998). Bicarbonate-mediated social communication stimulates meiosis and sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 623–631.
- Palková, Z., and Váchová, L. (2006). Life within a community: benefit to yeast long-term survival. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 806–824.
- Palková, Z., Janderová, B., Gabriel, J., Zikánová, B., Pospisek, M., and Forstová, J. (1997). Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* 390, 532–536.
- Palková, Z., Devaux, F., Icíková, M., Mináriková, L., Le Crom, S., and Jacq, C. (2002). Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Mol. Biol. Cell* 13, 3901–3914.
- Pan, Y., and Shadel, G.S. (2009). Extension of chronological life span by reduced TOR signaling requires down-regulation of Sch9p and involves increased mitochondrial OXPHOS complex density. *Aging (Albany NY)* 1, 131–145.
- Peters, A.C., Wimpenny, J.W., and Coombs, J.P. (1987). Oxygen profiles in, and in the agar beneath, colonies of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus albus* and *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 133, 1257–1263.
- Piccirillo, S., White, M.G., Murphy, J.C., Law, D.J., and Honigberg, S.M. (2010). The Rim101p/PacC pathway and alkaline pH regulate pattern formation in yeast colonies. *Genetics* 184, 707–716.
- Ricicová, M., Kucerová, H., Váchová, L., and Palková, Z. (2007). Association of putative ammonium exporters Ato with detergent-resistant compartments of plasma membrane during yeast colony development: pH affects Ato1p localisation in patches. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 1170–1178.
- Rintala, E., Toivari, M., Pitkänen, J.P., Wiebe, M.G., Ruohonen, L., and Penttilä, M. (2009). Low oxygen levels as a trigger for enhancement of respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics* 10, 461.
- Smets, B., Ghillebert, R., De Snijder, P., Binda, M., Swinnen, E., De Virgilio, C., and Winderickx, J. (2010). Life in the midst of scarcity: adaptations to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 56, 1–32.
- Soulard, A., Cremonesi, A., Moes, S., Schütz, F., Jenő, P., and Hall, M.N. (2010). The rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that TOR controls protein kinase A toward some but not all substrates. *Mol. Biol. Cell* 21, 3475–3486.
- Tate, J.J., Georis, I., Dubois, E., and Cooper, T.G. (2010). Distinct phosphatase requirements and GATA factor responses to nitrogen catabolite repression and rapamycin treatment in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 285, 17880–17895.
- Váchová, L., and Palková, Z. (2005). Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. *J. Cell Biol.* 169, 711–717.
- Váchová, L., Devaux, F., Kucerová, H., Ricicová, M., Jacq, C., and Palková, Z. (2004). Sok2p transcription factor is involved in adaptive program relevant for long term survival of *Saccharomyces cerevisiae* colonies. *J. Biol. Chem.* 279, 37973–37981.
- Váchová, L., Chernyavskiy, O., Strachotová, D., Bianchini, P., Burdíkova, Z., Ferciková, I., Kubínová, L., and Palková, Z. (2009a). Architecture of developing multicellular yeast colony: spatio-temporal expression of Ato1p ammonium exporter. *Environ. Microbiol.* 11, 1866–1877.
- Váchová, L., Kucerová, H., Devaux, F., Ulehlová, M., and Palková, Z. (2009b). Metabolic diversification of cells during the development of yeast colonies. *Environ. Microbiol.* 11, 494–504.
- Yang, Z., Geng, J., Yen, W.L., Wang, K., and Klionsky, D.J. (2010). Positive or negative roles of different cyclin-dependent kinase Pho85-cyclin complexes orchestrate induction of autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* 38, 250–264.
- Zikánová, B., Kuthan, M., Ricicová, M., Forstová, J., and Palková, Z. (2002). Amino acids control ammonia pulses in yeast colonies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 962–967.

Reactive oxygen species in multicellular microbial communities

Michal Čáp, Libuše Váchová a Zdena Palková

Oxidative Medicine and Cellular Longevity (zasláno k recenzi)

IF=2,468

Přehledný článek shrnuje dostupnou literaturu o úloze reaktivních forem kyslíku (ROS) v mnohobuněčných strukturách (tj. biofilmech a koloniích) tvořených bakteriemi a kvasinkami. Zaměřili jsme se zejména na úlohu ROS jako možné signalizační molekuly u mikroorganismů. V první části popisujeme úlohu ROS při vývoji kolonií *S. cerevisiae* podle výsledků získaných v naší laboratoři a prezentovaných také v této práci. ROS pravděpodobně ovlivňují fyziologické vývoj kolonie ve dvou obdobích. Podle fenotypů delečních kmenů *sod1Δ*, *sod2Δ* a *ctt1Δ* jsme navrhli mechanismus možné regulace iniciace produkce amoniaku v mladých koloniích v acidické fázi růstu pomocí ROS. Zdá se, že by rozhodujícím faktorem pro spuštění produkce amoniaku mohl být poměr nebo určitý gradient ROS, a především peroxidu vodíku, mezi mitochondriemi a cytosolem. Tento poměr nebo gradient by generoval signál spouštějící procesy vedoucí k produkci amoniaku a následnou diferenciaci kolonie. Druhým bodem, kde ROS hrají roli je právě diferenciaci kolonie. Při ní dochází ke zvýšené produkci ROS ve spodní vrstvě buněk ve středu kolonie.

Další části článku se zaměřují na možnou úlohu ROS jako signálních a regulačních molekul v biofilmech nejrozličnějších bakteriálních druhů a také kvasinky *C. albicans*. V těchto případech bylo popsáno množství případů, kdy ROS nějakým způsobem ovlivňují tvorbu nebo vývoj biofilmu. Například vznik genetické variability v bakteriálních biofilmech je způsoben endogenně produkovaným peroxidem vodíku a následnými genomovými přestavbami. Některé ze signálních drah účastnících se tvorby biofilmu, jako je quorum sensing nebo indolová signalizace, je ovlivňováno ROS. Zdá se tedy, že i u mikroorganismů, podobně jako u vyšších eukaryot jsou ROS nejen zdrojem oxidativního poškození buněčných komponent, ale i signálními molekulami.

Reactive oxygen species in the signaling and adaptation of multicellular microbial communities

Michal Čáp¹, Libuše Váchová² and Zdena Palková¹

¹ Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Sciences, Charles University in Prague, 128 44 Prague 2, Czech Republic.

² Institute of Microbiology of the ASCR, v.v.i., 142 20 Prague 4, Czech Republic.

Correspondence to: Z. Palková, zdenap@natur.cuni.cz

Abstract

One of the universal traits of microorganisms is their ability to form multicellular structures, the cells of which differentiate and communicate via various signaling molecules. Reactive oxygen species (ROS), and hydrogen peroxide in particular, have recently become well-established signaling molecules in higher eukaryotes, but still little is known about the regulatory functions of ROS in microbial structures. Here we summarize current knowledge on the possible roles of ROS during the development of colonies and biofilms, representatives of microbial multicellularity. In *Saccharomyces cerevisiae* colonies, ROS are predicted to participate in regulatory events involved in the induction of ammonia signaling and later on in programmed cell death in the colony centre. While the latter process seems to be induced by the total ROS, the former event is likely to be regulated by ROS-homeostasis, possibly H₂O₂-homeostasis between the cytosol and mitochondria. In *Candida albicans* biofilms, the predicted signaling role of ROS is often linked with quorum sensing molecules such as farnesol that significantly affect biofilm formation. In bacterial biofilms, ROS induce genetic variability, promote cell death in specific biofilm regions and possibly regulate biofilm development. Thus, the number of examples suggesting ROS function as signaling molecules and effectors in the development of microbial multicellularity is rapidly increasing.

Introduction

Since the first observations of microorganisms by Antonie van Leeuwenhoek and their isolation and cultivation by Robert Koch, microorganisms have been traditionally viewed as simple unicellular organisms. As a result of this presumption, all microbial studies have been conducted using shaken liquid cultivations. However, during the last few decades, it has become obvious that microorganisms are able to form multicellular structures such as colonies and biofilms. More and more examples of multicellularity have been described, and it has become evident that multicellular behavior, although initially considered an exception, is instead the rule for microbes. Species of the most distant clades of both Archea and Bacteria form biofilms, as did their ancestors some 3.3 billion years ago, indicating that biofilm formation is a universal and ancient bacterial trait [1]. Multicellular biofilms and colonies are also formed by yeasts. The biofilm community is thus a major form of bacterial, and also yeast, survival in natural environments.

The structural complexity and degree of organization of microbial multicellular structures vary from a simple single-layer biofilm and simple aggregates to complicated structures like the fruiting bodies of myxobacteria and slime molds, complex natural biofilms and the colonies of various microbes. Importantly, cells within these structures differentiate and use various signaling molecules to coordinate and regulate the metabolism and development of the community. All these characteristics, i.e. structural complexity, cellular differentiation, intercellular signaling and coordinated development, are basic attributes of true multicellularity. However, unlike conventional multicellular organisms, microorganisms retained the ability to survive and divide in their unicellular state.

The biofilm community gains a number of unique properties, especially in terms of resistance to various stresses and toxins. This is of particular importance, because the resistance of biofilms to medical treatment is an important problem in current infection control. For this reason, biofilms have become the subject of intensive research in recent years [2].

The production of reactive oxygen species (ROS) is an inevitable consequence of an aerobic lifestyle. Because of their reactive nature, ROS can cause oxidative damage to DNA, proteins, lipids and other cellular components, and an excess of them leads to extensive cell damage and eventually cell death. To protect themselves from the deleterious effect of ROS, cells have evolved many defensive mechanisms including, for example, enzymes capable of ROS removal, such as catalase, and various peroxidases for the removal of hydrogen peroxide or superoxide dismutase, eliminating superoxide radicals. Although ROS have been traditionally viewed as purely harmful, a more complex picture of their role in cellular physiology has been gradually emerging over the last

decade. Recent data have suggested that a certain level of ROS is in fact beneficial to longevity through the adaptive mechanism called hormesis [3, 4]. During hormesis, low doses of stress or toxin induce mechanisms that protect the organism against this stressor and evoke cross-adaptation to other stresses. In addition, a growing number of data suggest that ROS participate in signaling pathways in plants, animals and fungi [5-7] and even in interspecies communication [8] and it has also been proposed that they play a role in the development of multicellularity [9]. Despite being widely accepted as signaling molecules in higher organisms, little is known about the role of ROS in microbial populations. However, the last few years have produced intriguing new data indicating that ROS-induced processes are involved in differentiation and signaling in yeast and bacterial communities.

Here, we focus on the functions of ROS in multicellular communities of unicellular yeast and bacteria. We review current knowledge on the possible roles of ROS and stress defense in the development of *S. cerevisiae* colonies. In the second part of this review, we summarize current knowledge on the role of oxidative stress defense and endogenous ROS production in other well-studied microbial multicellular structures – *Candida albicans* and bacterial biofilms.

***Saccharomyces cerevisiae* colonies**

The yeast *S. cerevisiae* is one of the most studied model organisms in genetics and molecular biology. It is also widely used for studies on the mechanisms of cellular aging, longevity, stress resistance and adaptation. However, very little is known about yeast life within multicellular communities and only a few groups (including ours) have performed pilot studies.

Signaling, stress defense and colony differentiation

Yeast colonies growing on a complex agar medium with a non-fermentable carbon source undergo several developmental stages characterized by changes in the pH of the surrounding medium, shifting from acidic to alkali and vice versa [10] (Fig.1). Alkalization of the medium is accompanied by the release of volatile ammonia that can act as a signaling molecule that is able to induce alkalization and ammonia production in neighboring colonies. Thus the development of colonies is synchronized [11]. After several days, the ammonia production declines and colonies enter the second acidic phase. Extensive transcriptional changes occur during the transition from the first acidic to the alkali phase (which occurs between day 7 and 11 of colony development) [12] indicating metabolic reprogramming from a typical respirative metabolism to a different, not yet fully characterized metabolic program. Among other things, genes involved in the mitochondrial

TCA cycle and oxidative phosphorylation are repressed while other metabolic genes (e.g. peroxisomal β -oxidation, amino acid metabolic genes, methylglyoxylate cycle) are induced. Interestingly, in parallel to metabolic reprogramming, the repression of a group of genes that belong to environmental stress response (ESR) genes [13] was observed. These genes also include important players in oxidative stress defense *CTT1*, *SOD1* and *CCP1* encoding for cytosolic catalase, cytosolic superoxide dismutase and mitochondrial cytochrome c peroxidase, respectively, and a master regulator of ESR genes, *MSN4* [12]. Later on during the alkali-to-2nd acidic phase transition, some ESR genes, e.g. *CTT1* are derepressed, while the expression of others such as *SOD1* is kept lower than in the 1st acidic phase. Expression changes agreed with the levels of the enzyme activities. Ctt1p and Sod1p activities decrease during the alkali phase and increase again after the alkali phase has turned into the second acidic phase [14, 15].

In parallel with metabolic reprogramming, the cells of a colony population significantly diversify. Until the beginning of the alkali phase and ammonia production, the colony population is relatively homogeneous. Upon entering the alkali phase, non-dividing cells in the colony, which account for the vast majority of the colony population, start to differentiate both in a horizontal and vertical direction. This horizontal diversification leads to the emergence of a cell population of non-dividing or slowly dividing chronologically aged cells in the colony center and to the cell population of the colony periphery, where colony accrual occurs and a significant number of cells still divide. Notable physiological differences were found between central and margin cells in terms of both their metabolism and stress-related features. First, central cells produce levels of ROS several times higher than cells from the colony margin and exhibit some features of programmed cell death, also in contrast to cells from the colony margin [14, 16]. Secondly, central cells maintain a relatively high activity of oxidative stress defense enzymes Sod1p, Sod2p and Ctt1p during the alkali phase, while a significant decrease in these activities was observed in margin cells [14]. Nevertheless, their increased antioxidant capacity obviously does not protect some of the central cells from high ROS production and cell death. Thirdly, changes in carbon metabolism typical for the acidic-to-alkali transition are mainly induced in the margin cells [14].

Ammonia signaling seems to be important for this differentiation. A detailed study of a strain with its *SOK2* gene deleted, Sok2p being a transcription factor involved in various signaling events regulated by the Ras-cAMP-PKA pathway, showed that the center-margin differences described in wild type colonies are diminished or absent in colonies of this ammonia-signaling-deficient strain [17]. Surprisingly, a very similar colony phenotype in terms of differentiation was observed in strains lacking mitochondrial superoxide dismutase Sod2p and cytosolic catalase Ctt1p, both of

which diminish ammonia signaling [14]. However, the absence of cytosolic superoxide dismutase Sod1p has a different phenotype. Colonies of the *sod1Δ* strain produce ammonia at the same time and even in slightly larger quantities than the wild type with colony differentiation even more pronounced than in the wild type [14].

The vertical differentiation observed in the central part of the colony results in two cell layers, the upper and the lower, composed of cells possessing completely different physiologies [18]. Cells of the upper layer are multiple-stress resistant and long-living and resistant to various stresses, while the cells of the lower layer produce more ROS, despite activating the expression of some stress-defense genes, and slowly die.

Role of stress-defense mechanisms in colonies: Direct defense or regulation?

Some of the results obtained using colonial populations are in stark contrast to studies on yeast liquid cultivations under starvation conditions, where the indispensability of ESR genes (including those encoding stress defense enzymes) and genes involved in mitochondrial respiration for the long-term survival of a liquid yeast population was shown [19-21]. For example, strains deficient in cytosolic superoxide dismutase Sod1p are known to have a severe oxygen-dependent growth defect, including lysine and methionine auxotrophies as a consequence of oxidative damage to the metabolic pathways synthesizing these amino acids [22]. The deletion of *SOD1* also dramatically decreases survival during aging [23]. These defects put selective pressure on the emergence of suppressor mutations compensating for these defects [24, 25]. On the other hand, the role of mitochondrial Sod2p and Ctt1p in the survival and longevity of liquid yeast populations is less evident. The absence of Sod2p has little effect during fermentative growth but its importance increases when growing on respiratory substrates, consistent with the presumed role of Sod2p in removing the superoxide radicals resulting from mitochondrial respiration [23]. The role of cytosolic catalase seems ambiguous, since its deletion leads to lower stress protection and a decreased ability to adapt to stress conditions on the one hand [26, 27], but also to increased survival during chronological aging on the other [28]. On the whole, antioxidant protection, or at least some of its components, seems to be important for the long-term survival of yeast populations in shaken liquid cultures.

The situation in colonies is almost the opposite. While *sod2Δ* and *ctt1Δ* colonies are incapable of ammonia signaling, sufficient metabolic reprogramming and differentiation and, consequently, their margin cell population exhibit decreased survival, *sod1Δ* colonies produce ammonia, differentiate and survive in the same manner as wild-type colonies. In addition, *sod1Δ* colonies

were almost free of cells with mutations suppressing the stress-sensitivity of *sod1Δ* in liquid cultivations. Altogether, *sod1Δ*, *sod2Δ* and *ctt1Δ* behavior as well as the observed drop in some stress-defense enzyme activities during the alkali phase suggest that it is alkalization, ammonia production and metabolic reprogramming, and not stress defense and direct removal of radicals, that matter in colony differentiation and the survival of part of the population [14, 29]. In addition, from day 5 onwards, the ROS level in the colony is considerably smaller than that in liquid cultivations ([14] and unpublished data) in both wild-type colonies and colonies of the *sod1Δ*, *sod2Δ* and *ctt1Δ* strains.

Why do *sod1Δ* colonies develop normally with even more pronounced differentiation than wild-type colonies, while the deletion of some other genes involved in antioxidative defense (*SOD2*, *CTT1*) is deleterious to the colony's ability to produce ammonia and differentiate? One possibility is that a ROS signaling pathway exists that regulates colony development (Fig.2). This pathway would be activated in wild-type colonies at a particular point in their development and could regulate the beginning of ammonia production (Fig.1). As hypothesized in Fig.2, the signal would be stronger in *sod1Δ* colonies, but weaker in *ctt1Δ* colonies and even weaker or absent in *sod2Δ* colonies. The observed phenotypes cannot be simply explained by an increase or decrease in a particular ROS concentration and some more complex mechanism is likely to be involved. Superoxide dismutases catalyze the dismutation of superoxide to hydrogen peroxide and oxygen and so participate in the interconversion of various ROS types. Thus the absence of either of cytosolic or mitochondrial SOD would lead to an increase in superoxide concentration and, simultaneously, to a decrease in H_2O_2 concentration in the respective compartment. This leads to alternation in the homeostasis and/or ratio of H_2O_2 concentration between the mitochondrial matrix and cytosol. In contrast to superoxide, H_2O_2 is relatively stable and can penetrate into other cellular compartments through the membranes. Changes in its production in different compartments thus lead to changes in the H_2O_2 gradients and homeostasis and/or H_2O_2 concentration ratio between the mitochondrial matrix and cytosol. We propose that this ratio, rather than the absolute concentration of any of the ROS, is the signal that leads to some of the initial changes resulting in ammonia production, alkalization and to the physiological changes connected with it. This model is consistent with the phenotype of *ctt1Δ* colonies, since the absence of this enzyme lowers the mitochondrial-to-cytosolic H_2O_2 ratio, similarly to the *sod2Δ* strain. A possible mode of action of H_2O_2 includes the regulation of protein function through peroxidedoxins and thioredoxins or protein modifications by S-glutathiolation and direct inactivation by H_2O_2 [5, 30, 31].

Since it has been shown that different ROS trigger different adaptive responses [32], there

clearly must be multiple ROS sensing pathways. That different ROS have different effects was shown in studies of the hormetic effect of superoxide and hydrogen peroxide on liquid cultivations. Both oxidants increase the longevity of the population when applied at moderate concentrations. While superoxide only induces longevity when applied during the logarithmic phase of growth, in contrast H_2O_2 only induces longevity when applied to stationary cultures [28, 33]. This would be consistent with its role in chronologically ageing colonies, as proposed above. Moreover, evidence from plant research indicates that the ROS signal is often generated in short pulses [6]. This indicates that not only the amount and type of ROS, but also the precise timing of the ROS signal could be important.

Alternatively, ROS-scavenging enzymes could possess other regulatory functions, possibly independent of their antioxidant properties. For example, the function of the voltage-dependent anion channel (VDAC), a porin of the mitochondrial outer membrane, is diminished in the absence of Sod1p [34]. VDAC plays an important role in regulating mitochondrial activity and apoptosis [35] and its closing leads to a decrease in metabolite exchange and communication between the mitochondrial intermembrane space and the cytosol [36, 37]. The absence of Sod1p also affects metabolic regulation in cells [38]. Deletion of the *SOD1* gene causes a lessening of glucose repression, an important regulatory mechanism affecting nearly all aspects of *S. cerevisiae* metabolism. Moreover, *sod1Δ* cells have an increased level of mitochondrial biomass when growing in both media, with a repressing or non-repressing carbon source. A systems biology approach has been used to identify, on the basis of large-scale protein-protein interactions studies, both Sod2p and, less significantly, Sod1p as possible regulators of the processes of DNA repair and chromatin remodeling [39].

ROS in programmed cell death in colony

Beside their possible role in signaling leading to ammonia production and the start of colony differentiation, ROS seem to play an important role in the further development of differentiated cells (Fig.1). Programmed cell death in yeast can be induced by various signals, but their common factor is an increased ROS concentration (for reviews on yeast apoptosis, see [40-43]). ROS therefore seem to be the executioners of programmed cell death in yeast. As described above, cells in the center of a differentiated colony undergo programmed cell death, while cells at the colony margin are healthy and free of ROS. In contrast, the decreased center-margin differentiation observed in the colonies of non-ammonia-producing strains results in an increased cell death rate at the colony margin [14, 16]. A relatively high production of ROS occurs in the center of

differentiated ammonia-producing wild-type and *sod1Δ* colonies. Notably, oxidative-stress-defense-deficient mutants that lack ammonia production (*sod2Δ* and *ctt1Δ*) do not exhibit increased ROS production in the colony center [14]. We propose that ROS are produced by the central cells in response to ammonia and/or alkalization and their production leads to cell death. ROS production in these cells is probably not a consequence of a low antioxidant capacity of the central cells, but rather part of a developmental program of the colony.

The dead cells in the colony center are likely to release nutrients that are then used by the cells at the edge of the colony to grow and survive [16, 44]. In addition, dead cells not only release nutrients from their biomass, but also stop consuming from the common nutrient pool. Since cells in the margin of the colony are younger and have better prospects of colonizing other localities, it makes sense if the colony invests in these prosperous cells at the expense of central cells. Opponents of the concept of programmed cell death in microorganisms could argue that cell death could bring no advantage for a unicellular organism, since the whole organism (one cell) dies and so this trait could not be a product of natural selection. However, when we consider unicellular organisms in terms of populations, it makes sense that the death of some cells could increase the prospects for survival of other cells in the same population. Moreover, microbial communities are often clonal in nature, i.e. they originate from one or a few cells and thus it is highly probable that the nutrients released by the sacrificed cells would benefit the kin of these cells, making this programmed cell death evolutionarily sustainable.

***Candida* biofilms**

Biofilms formed by *Candida* sp. can be serious problems in medical treatment, as they are usually highly resistant to extracellular toxins and drugs. ROS presumably play some role in *Candida* biofilms. Transcriptomic studies revealed that the biofilm population increases the expression of stress-defense genes, in particular those involved in combating oxidative stress, when compared to planktonic cultures [45]. Similar results were confirmed at the proteomic level [46]. The ROS level is dramatically decreased in biofilm when compared to a planktonic cultivation [46]. Whether this is a consequence of the activation of antioxidant mechanisms in biofilms or whether life in the biofilm *per se* results in a decreased ROS production (as with life in a colony) is unclear. It seems that a common mechanism for oxidative stress resistance and multicellular behavior exists in *C. albicans*, since cell adhesion, biofilm formation and oxidative stress resistance are influenced by a common factor, the cell wall protein Hwp2p [47]. As the release of ROS during phagocyte respiratory burst is a crucial part of the immune response, adaptation to oxidative stress and

oxidative stress defense enzymes help the yeast cells to survive respiratory burst and are thus important factors in pathogen virulence [48]. The increased oxidative stress defense of biofilms could also be responsible for their increased resistance to antifungal agents such as azoles, the toxicity of which involves the production of ROS [49].

Farnesol signaling and ROS

Intercellular signaling by farnesol is involved in the induction of oxidative stress defense. Farnesol is a sesquiterpene alcohol produced by *Candida* sp. that acts as a quorum sensing (QS) molecule [50]. Quorum sensing is a synchronized transcriptional response of a microbial population to the presence of a small molecule called an autoinducer. Given that the autoinducer is produced continuously by all cells in the population, its concentration is proportional to the cell density.

Farnesol in *C. albicans* was shown to inhibit hyphae formation [51], to inhibit biofilm growth [52], to induce programmed cell death [53], to evoke ROS production [54] and to promote resistance to oxidative stress [55]. The latter involves farnesol-induced catalase expression via inhibition of the Ras-cAMP pathway [54] and, in parallel, farnesol-induced ROS production, which adapts cells to oxidative stress and induces protective mechanisms [56]. Farnesol thus acts as an intercellular adaptive signal that confers oxidative stress resistance to the cells within the same population. It is possible that the farnesol-induced high level of ROS, and membrane-permeable hydrogen peroxide in particular, participate in the farnesol signaling pathway, thus behaving as another intercellular signaling molecule. The possible signaling role of H₂O₂ in *C. albicans* is illustrated by the findings that low concentrations of hydrogen peroxide can induce the yeast-to-hyphal morphological transition [57], while higher concentrations induce programmed cell death [58, 59]. It was shown that H₂O₂ activates the AP-1-like stress-responsive transcription factor Cap1p, the stress-activated protein kinase Hog1p and also the checkpoint kinase Rad53p, which regulates hyperpolarized bud growth and filamentation [60-62]. Interestingly, these H₂O₂-regulated pathways are regulated and coordinated by the antioxidant enzyme thioredoxin, which appears to be a master regulator of redox signaling in *C. albicans* [60].

Farnesol also induces ROS production in other fungal and bacterial species [63-65]. Farnesol can thus act like an antibiotic, killing competing microbes and, in parallel, it induces mechanisms (e.g. cAMP-mediated oxidative stress adaptation) that protect the producing cells from farnesol's toxic effect. A similar strategy was described in killer toxins produced by other yeast species [66]. Different outcomes described for farnesol signaling (i.e. adaptation, differentiation or apoptotic cell death) could be the consequences of various concentrations of farnesol and combination of the

farnesol signal with other factors e.g., other signaling molecules, cell physiology, nutrient status and cell location in the biofilm.

Bacterial biofilm

The stages of biofilm formation, i.e. attachment, maturation and dispersal of the bacterial biofilm, are all regulated by environmental cues as well as by intercellular signaling molecules [2, 67]. The role of various QS signals, indole and polyamine signaling in the regulation of biofilm development has been described. Beside these signaling molecules, ROS are another possible signal involved in biofilm formation. The role of ROS in cell death and the generation of genetic variants within a biofilm is well-described, while ROS' signaling function and cross-talk with other signaling pathways as well as their role in microbe-microbe, host-pathogen or host-symbiont types of interactions are slowly emerging but mostly remain to be discovered.

ROS-induced diversity and differentiation of cells within a biofilm

Many bacterial species develop genetic variability when growing within a biofilm, but not during cultivations of planktonic cells [68-71]. Variability was demonstrated as the frequency of the different colony morphotypes, resistance to antibiotics, swimming and sliding motility and exopolysaccharide production. Since different environmental conditions require different cell adaptations, genetic variability increases the chances of the community surviving under a broader spectrum of conditions. In the biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*, the emergence of their genetic variability is dependent on oxidative-stress-induced DNA double-strand breaks and on their repair by the RecA system, which introduces genome rearrangements [69]. Interestingly, increasing resistance to oxidative stress or adding an antioxidant to the medium significantly reduced cell variance in the biofilm, while deletion of the catalase gene increased the variance [69]. ROS- and RecA-dependent biofilm cell variation was also described in *Listeria monocytogenes* [72]. Similar results were obtained from studies of *Staphylococcus pneumoniae* biofilm phenotypic variation. In this case, the “suicide” gene *spxB* encodes for pyruvate oxidase, which produces high amounts of hydrogen peroxide and which is responsible for the unusually high death rate in *S. pneumoniae* stationary cultures and possibly also in biofilms [73, 74]. Likewise, SpxB-mediated production of H₂O₂ induces the cell death of about 10% of the population, leading to the release of DNA from the cells in two oral bacterial species, *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* [75, 76]. This extracellular DNA (eDNA) is an important part of the biofilm extracellular matrix, it enhances cell-cell adhesion, regulates biofilm dispersal, serves as a nutrient source and is available to be

taken up and incorporated into the chromosome by competent cells. Given that streptococcal biofilms contain a high percentage of competent cells [77], eDNA release could be an important factor in creating genetic variability in biofilms. Moreover, the mutagenic activity of H₂O₂ [78] towards eDNA even increases this variability. Interestingly, *spxB* expression is controlled by the catabolic repression regulator CcpA, linking the roles of metabolism and H₂O₂ in biofilm development [79]. Hydrogen-peroxide-induced genetic variation and cell death was also reported in biofilms of *Pseudoalteromonas tunicata*, *Marinomonas mediterranea*, *Caulobacter crescentus* and *Chromobacterium violaceum*, depending on the presence of the lysine oxidase encoded by the *alpP* gene and its homologues [80]. This hydrogen peroxide-producing enzyme is common among bacterial species, which makes variability and cell death regulated by ROS a common bacterial trait. Interestingly, AlpP-mediated cell death is also important for dispersal of the biofilm, i.e. the release of planktonic cells from the biofilm. Cell death in the biofilm center presumably provides nutrients that increase the size, metabolic activity and phenotypic variability of the dispersed cells [81]. Remarkably, besides H₂O₂, lysine oxidase also produces ammonia, but its possible signaling function in biofilms has not been explored. *P. aeruginosa* biofilm dispersal and cell differentiation is also regulated by the signaling molecule nitric oxide, a radical that could give rise to a spectrum of oxidants called reactive nitrogen species (RNS). Low concentrations of NO caused biofilm dispersal and enhanced swimming and swarming cell motilities, while higher NO concentrations induced cell death [82]. At least some of these effects are probably induced by NO-derived RNS, as RNS were detected in the biofilm. NO is produced by *P. aeruginosa* cells under anaerobic conditions through anaerobic respiration from nitrates and nitrites, and is further reduced by NO reductase. Since the interior of a *P. aeruginosa* biofilm is a hypoxic environment [83, 84], the level of anaerobic NO and RNS production should be proportional to biofilm depth. In this way, cell position within the biofilm could be sensed and dispersal and cell death could be co-regulated with biofilm growth [82].

Endogenous ROS production in the biofilm is the source of the high variability of biofilm cells, and ROS could act as a signal that mediates the cell death of a sensitive subpopulation in the deeper layers of the biofilm and metabolic differentiation in the upper part of the biofilm. The bacterial biofilm communities thus strikingly resemble metabolic differentiation and ammonia-regulated cell death in *S. cerevisiae* colonies described above. Whether ROS-mediated cell death is part of programmed colony/biofilm development or it is simply the inability of a sensitive subpopulation to withstand the accumulation of toxic by-products of metabolism remains an unanswered question. The findings from yeast colonies and bacterial biofilms showing that cell death in one

subpopulation leads to metabolic activity and variability in the other subpopulation, and thus increase fitness of the population as a whole, argue for the former option.

ROS-dependent signaling in biofilm

Biofilm development is probably governed by both environmental cues as well as by intercellular signaling molecules. The best-studied intercellular signal is QS, which also plays a role in biofilm formation and development. A variety of autoinducer molecules have been identified in bacteria, of which the most studied are the species-specific acylated homoserine lactones (AHLs) found in many Gram-negative bacteria and the furonosyl borate ester AI-2 produced and recognized by both Gram-positive and Gram-negative species. It has been proposed that many autoinducers are able to induce ROS production, making ROS possible downstream signals or effectors of QS pathways [85]. QS plays an important role in the processes of biofilm formation and dispersal. For example, QS signaling through AI-2 in *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus epidermis* and the autoinducer protein AIP in *Staphylococcus aureus* inhibit biofilm formation. In contrast, a positive effect on biofilm formation was described for AI-2 signaling in *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus rhamnosus* as well as in AHL-mediated QS in *P. aeruginosa* [67, 86]. Interestingly, ROS seem to be able to modulate quorum sensing in various ways. ROS can inhibit autoinducer peptide signaling in *S. aureus* *in vitro* [87]. In a study of the mouse skin infection model, ROS-producing enzymes of the immune system were indispensable for defense against infection by the wild-type *S. aureus* strain, but not necessary for defense against a QS-deficient strain, indicating that QS molecules could be a target for oxidation by the immune system *in vivo* [87]. Superoxide also decreases the expression of QS locus *comQXP* in *B. subtilis* [88]. On the other hand, ROS have the potential to increase the QS signal, as certain derivatives of AHL oxidation by ROS exhibit increased biological activity [89]. In addition, QS regulates the expression of oxidative stress defense genes in various bacterial species [90-93].

Additional indications of ROS-dependent signaling pathways regulating biofilm growth have recently appeared. *Enterococcus faecalis* biofilm formation is dependent on the presence of the *xdh* gene, presumably encoding for a selenoprotein xanthine dehydrogenase involved in purine metabolism and uric acid utilization and possibly evoking ROS production [94]. Cells in a *E. faecalis* biofilm produce high levels of ROS via a mechanism that is reliant on the presence of xanthine dehydrogenase, its cofactors selenium and molybdenum and its substrate uric acid. An intriguing model was proposed, in which uric acid in the environment is metabolized by *E. faecalis* cells with concomitant H₂O₂ production, which in turn induces biofilm formation. H₂O₂ thus would

be a metabolic by-product with a signaling function. Since uric acid is abundant in blood and urine, i.e. preferred environments for *E. faecalis*, it makes sense that detecting this metabolite triggers the formation of the biofilm to successfully colonize the host [94].

In multispecies oral biofilms, streptococci produce H_2O_2 from pyruvate as a mean of biochemical warfare against other species, as well as a regulator of its own development as described above. However, the oral pathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* uses this streptococci-produced H_2O_2 as a signal that activates the expression of the complement resistance protein ApiA, which helps *A. actinomycetemcomitans* to resist the host's nonspecific immune response [95].

Some results suggest that ROS play a role in modulating the indole signaling pathway. Indole acts as an intercellular signal in many bacterial species. Similarly to other signaling molecules, indole even induces a response in some species that do not synthesize it, and thus acts as an interspecies signaling molecule. In *Escherichia coli*, indole, which is synthesized by the enzymes coded by the *tnaAL* operon, inhibits biofilm growth, regulates pathogenicity and the expression of multi-drug resistance genes [96, 97]. Among other signals, *tnaA* expression is induced by ROS and repressed by growth in a biofilm [98, 99]. Indole was proposed to act as an oxidant in membranes and to induce membrane rearrangements [100]. Furthermore, some antibiotics induce indole production, which consequently inhibits biofilm formation in *E. coli*, via a mechanism involving hydrogen peroxide [101], showing that indole signaling and H_2O_2 cooperate in a pathway inhibiting biofilm growth. The opposite results, i.e. indole-induced biofilm formation in *E. coli* and other species, were reported by others [102].

Biofilms and oxidative stress adaptation

As with *C. albicans* biofilms and *S. cerevisiae* colonies, there is obviously a connection between the life of bacteria within a multicellular structure (biofilm) and their adaptation to oxidative stress. A number of genes have been identified that are important for both biofilm growth and oxidative stress resistance. Examples are the transcriptional repressor Rex and trigger factor RpoS in *Streptococcus mutans* [103, 104], *in-silico*-identified genes *uspE* and *gadX* in *E. coli* [105], posttranslational regulator CsrA in *Campylobacter jejuni* [106] and two-component systems GacS-GacA in *Pseudomonas* sp. and ColR-ColS in *Xanthomonas citri* [107, 108]. The redox-sensitive DNA-binding protein OxyR is a well-studied transcription regulator that mediates oxidative stress response in many Gram-negative bacteria. OxyR is activated by forming an intramolecular disulfide bond upon reaction with H_2O_2 , which leads to the expression of OxyR-regulated genes. The role of

OxyR in biofilm formation has been described in several bacterial species. In *E. coli*, OxyR induces biofilm formation by activating expression of the surface adhesin Ag43, which is responsible for cell-to-cell attachment and surface adherence [109]. Similarly, OxyR regulates cell attachment by increasing the expression of adherent fimbriae in *Serratia marcescens* and *Klebsiella pneumoniae* [110, 111] and OxyR's function in biofilm formation was also reported in *Neisseria gonorrhoeae* and *Tannerella forsythia* [112, 113].

Conclusions

Both endogenous and exogenous reactive oxygen species are important stress factors in the life of microorganisms. Endogenous ROS production is an inevitable consequence of microbial life in the presence of oxygen and can be even potentiated by some antibiotics that induce ROS production in sensitive microbes. Exogenous ROS can be encountered during immune response to the presence of microbes inside the animal or plant body. In addition, many bacterial species release ROS as an oxidative weapon against competitors in multispecies populations. In these cases, ROS are produced by specialized enzymes. ROS are thus widely used as a means of biochemical warfare in nature. In order to defend against the deleterious effects of ROS, microorganisms have evolved efficient mechanisms of ROS removal. On the other hand, various pieces of data suggest that ROS could play an active and important role in processes like growth autoinhibition, cell death and biofilm/colony development in both yeast and bacteria. In such cases, the enzymes producing ROS are tightly regulated as part of a biofilm developmental program and ROS are the effectors of some intrinsic regulation. Finally, ROS can act as signaling molecules either by targeting specific signaling pathways (e.g. kinases or transcription factors) or by, for example, modifying other signaling molecules such as quorum sensing factors. The large number of ROS-producing enzymes and the many different responses to ROS suggest that ROS-mediated processes are universal in the microbial world. Improving our understanding of the regulation and signaling driven by ROS could thus provide deeper insight into complex biological processes including the formation of biofilms, multicellular structures with important implications in medicine and other fields. The possibility of interfering with the signaling involved in biofilm formation or biofilm dispersal with ROS-producing or ROS-scavenging agents is especially attractive.

Acknowledgements

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (204/08/0718), the Ministry of Education MSM0021620858, RVO 61388971 and Charles University in Prague (SVV-

References

1. Hall-Stoodley, L., J.W. Costerton, and P. Stoodley, *Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(2): p. 95-108.
2. Lopez, D., H. Vlamakis, and R. Kolter, *Biofilms*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(7): p. a000398.
3. Pan, Y., *Mitochondria, reactive oxygen species, and chronological aging: a message from yeast*. Exp Gerontol, 2011. **46**(11): p. 847-52.
4. Ristow, M. and S. Schmeisser, *Extending life span by increasing oxidative stress*. Free Radic Biol Med, 2011. **51**(2): p. 327-36.
5. Finkel, T., *Signal transduction by reactive oxygen species*. J Cell Biol, 2011. **194**(1): p. 7-15.
6. Mittler, R., et al., *ROS signaling: the new wave?* Trends Plant Sci, 2011. **16**(6): p. 300-9.
7. Scott, B. and C.J. Eaton, *Role of reactive oxygen species in fungal cellular differentiations*. Curr Opin Microbiol, 2008. **11**(6): p. 488-93.
8. Torres, M.A., *ROS in biotic interactions*. Physiol Plant, 2010. **138**(4): p. 414-29.
9. Lalucque, H. and P. Silar, *NADPH oxidase: an enzyme for multicellularity?* Trends Microbiol, 2003. **11**(1): p. 9-12.
10. Palkova, Z., et al., *Ammonia mediates communication between yeast colonies*. Nature, 1997. **390**(6659): p. 532-6.
11. Palkova, Z. and J. Forstova, *Yeast colonies synchronise their growth and development*. J Cell Sci, 2000. **113** (Pt 11): p. 1923-8.
12. Palkova, Z., et al., *Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(11): p. 3901-14.
13. Gasch, A.P. and M. Werner-Washburne, *The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation*. Funct Integr Genomics, 2002. **2**(4-5): p. 181-92.
14. Cap, M., L. Vachova, and Z. Palkova, *Yeast colony survival depends on metabolic adaptation and cell differentiation rather than on stress defense*. J Biol Chem, 2009. **284**(47): p. 32572-81.
15. Vachova, L., et al., *Metabolic diversification of cells during the development of yeast colonies*. Environ Microbiol, 2009. **11**(2): p. 494-504.
16. Vachova, L. and Z. Palkova, *Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia*. J Cell Biol, 2005. **169**(5): p. 711-7.
17. Vachova, L., et al., *Sok2p transcription factor is involved in adaptive program relevant for long term survival of Saccharomyces cerevisiae colonies*. J Biol Chem, 2004. **279**(36): p. 37973-81.
18. Cap, M., et al., *Cell differentiation within a yeast colony: Metabolic and regulatory parallels with a tumor-affected organism*. Mol Cell, 2012. doi:10.1016/j.molcel.2012.04.001.
19. Gresham, D., et al., *System-level analysis of genes and functions affecting survival*

- during nutrient starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 2011. **187**(1): p. 299-317.
20. Petti, A.A., et al., *Survival of starving yeast is correlated with oxidative stress response and nonrespiratory mitochondrial function*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(45): p. E1089-98.
 21. Wu, J., et al., *Global analysis of nutrient control of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during growth and starvation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(9): p. 3148-53.
 22. Liu, X.F., et al., *Yeast lacking superoxide dismutase. Isolation of genetic suppressors*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(26): p. 18298-302.
 23. Longo, V.D., E.B. Gralla, and J.S. Valentine, *Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(21): p. 12275-80.
 24. Jensen, L.T., et al., *Mutations in *Saccharomyces cerevisiae* iron-sulfur cluster assembly genes and oxidative stress relevant to Cu,Zn superoxide dismutase*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(29): p. 29938-43.
 25. Lapinskas, P.J., et al., *Mutations in PMR1 suppress oxidative damage in yeast cells lacking superoxide dismutase*. *Mol Cell Biol*, 1995. **15**(3): p. 1382-8.
 26. Izawa, S., Y. Inoue, and A. Kimura, *Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae**. *Biochem J*, 1996. **320** (Pt 1): p. 61-7.
 27. Schuller, C., et al., *The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene*. *EMBO J*, 1994. **13**(18): p. 4382-9.
 28. Mesquita, A., et al., *Caloric restriction or catalase inactivation extends yeast chronological lifespan by inducing H₂O₂ and superoxide dismutase activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(34): p. 15123-8.
 29. Cap, M., L. Vachova, and Z. Palkova, *How to survive within a yeast colony?: Change metabolism or cope with stress?* *Commun Integr Biol*, 2010. **3**(2): p. 198-200.
 30. Hill, B.G. and A. Bhatnagar, *Protein S-glutathiolation: Redox-sensitive regulation of protein function*. *J Mol Cell Cardiol*, 2012. **52**(3): p. 559-67.
 31. Nulton-Persson, A.C. and L.I. Szweda, *Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(26): p. 23357-61.
 32. Temple, M.D., G.G. Perrone, and I.W. Dawes, *Complex cellular responses to reactive oxygen species*. *Trends Cell Biol*, 2005. **15**(6): p. 319-26.
 33. Pan, Y., et al., *Regulation of yeast chronological life span by TORC1 via adaptive mitochondrial ROS signaling*. *Cell Metab*, 2011. **13**(6): p. 668-78.
 34. Karachitos, A., et al., *Cu,Zn-superoxide dismutase is necessary for proper function of VDAC in *Saccharomyces cerevisiae* cells*. *FEBS Lett*, 2009. **583**(2): p. 449-55.
 35. Lemasters, J.J. and E. Holmuhamedov, *Voltage-dependent anion channel (VDAC) as mitochondrial governor--thinking outside the box*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1762**(2): p. 181-90.
 36. Galganska, H., et al., *Redox regulation of protein expression in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria: possible role of VDAC*. *Arch Biochem Biophys*, 2008.

- 479(1): p. 39-45.
37. Han, D., et al., *Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol*. J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 5557-63.
 38. Sehati, S., et al., *Metabolic alterations in yeast lacking copper-zinc superoxide dismutase*. Free Radic Biol Med, 2011. **50**(11): p. 1591-8.
 39. Bonatto, D., *A systems biology analysis of protein-protein interactions between yeast superoxide dismutases and DNA repair pathways*. Free Radic Biol Med, 2007. **43**(4): p. 557-67.
 40. Buttner, S., et al., *Why yeast cells can undergo apoptosis: death in times of peace, love, and war*. J Cell Biol, 2006. **175**(4): p. 521-5.
 41. Carmona-Gutierrez, D., et al., *Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines*. Cell Death Differ, 2010. **17**(5): p. 763-73.
 42. Gourlay, C.W., W. Du, and K.R. Ayscough, *Apoptosis in yeast--mechanisms and benefits to a unicellular organism*. Mol Microbiol, 2006. **62**(6): p. 1515-21.
 43. Madeo, F., et al., *Caspase-dependent and caspase-independent cell death pathways in yeast*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **382**(2): p. 227-31.
 44. Fabrizio, P., et al., *Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biol, 2004. **166**(7): p. 1055-67.
 45. Yeater, K.M., et al., *Temporal analysis of Candida albicans gene expression during biofilm development*. Microbiology, 2007. **153**(Pt 8): p. 2373-85.
 46. Seneviratne, C.J., et al., *Candida albicans biofilm formation is associated with increased anti-oxidative capacities*. Proteomics, 2008. **8**(14): p. 2936-47.
 47. Younes, S., et al., *The Candida albicans Hwp2 is necessary for proper adhesion, biofilm formation and oxidative stress tolerance*. Microbiol Res, 2011. **166**(5): p. 430-6.
 48. Brown, A.J., K. Haynes, and J. Quinn, *Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity*. Curr Opin Microbiol, 2009. **12**(4): p. 384-91.
 49. Vandenbosch, D., et al., *Fungicidal activity of miconazole against Candida spp. biofilms*. J Antimicrob Chemother, 2010. **65**(4): p. 694-700.
 50. Hornby, J.M., et al., *Quorum sensing in the dimorphic fungus Candida albicans is mediated by farnesol*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(7): p. 2982-92.
 51. Davis-Hanna, A., et al., *Farnesol and dodecanol effects on the Candida albicans Ras1-cAMP signalling pathway and the regulation of morphogenesis*. Mol Microbiol, 2008. **67**(1): p. 47-62.
 52. Ramage, G., et al., *Inhibition of Candida albicans biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule*. Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(11): p. 5459-63.
 53. Shirliff, M.E., et al., *Farnesol-induced apoptosis in Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(6): p. 2392-401.
 54. Deveau, A., et al., *Farnesol induces hydrogen peroxide resistance in Candida albicans yeast by inhibiting the Ras-cyclic AMP signaling pathway*. Eukaryot Cell, 2010. **9**(4): p. 569-77.
 55. Westwater, C., E. Balish, and D.A. Schofield, *Candida albicans-conditioned medium protects yeast cells from oxidative stress: a possible link between quorum sensing and oxidative stress resistance*. Eukaryot Cell, 2005. **4**(10): p. 1654-61.
 56. Jamieson, D.J., D.W. Stephen, and E.C. Terriere, *Analysis of the adaptive oxidative*

- stress response of Candida albicans*. FEMS Microbiol Lett, 1996. **138**(1): p. 83-8.
57. Nasution, O., et al., *Hydrogen peroxide induces hyphal differentiation in Candida albicans*. Eukaryot Cell, 2008. **7**(11): p. 2008-11.
 58. Lu, H., et al., *Lack of trehalose accelerates H₂O₂-induced Candida albicans apoptosis through regulating Ca²⁺ signaling pathway and caspase activity*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. e15808.
 59. Phillips, A.J., I. Sudbery, and M. Ramsdale, *Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in Candida albicans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(24): p. 14327-32.
 60. da Silva Dantas, A., et al., *Thioredoxin regulates multiple hydrogen peroxide-induced signaling pathways in Candida albicans*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(19): p. 4550-63.
 61. Smith, D.A., et al., *A conserved stress-activated protein kinase regulates a core stress response in the human pathogen Candida albicans*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(9): p. 4179-90.
 62. Zhang, X., et al., *Analysis of the oxidative stress regulation of the Candida albicans transcription factor, Cap1p*. Mol Microbiol, 2000. **36**(3): p. 618-29.
 63. Cugini, C., D.K. Morales, and D.A. Hogan, *Candida albicans-produced farnesol stimulates Pseudomonas quinolone signal production in LasR-defective Pseudomonas aeruginosa strains*. Microbiology, 2010. **156**(Pt 10): p. 3096-107.
 64. Semighini, C.P., et al., *Farnesol-induced apoptosis in Aspergillus nidulans reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi*. Mol Microbiol, 2006. **59**(3): p. 753-64.
 65. Machida, K., et al., *Farnesol-induced generation of reactive oxygen species via indirect inhibition of the mitochondrial electron transport chain in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol, 1998. **180**(17): p. 4460-5.
 66. Schmitt, M.J. and F. Breinig, *Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection*. Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(3): p. 212-21.
 67. Karatan, E. and P. Watnick, *Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms*. Microbiol Mol Biol Rev, 2009. **73**(2): p. 310-47.
 68. Allegrucci, M. and K. Sauer, *Characterization of colony morphology variants isolated from Streptococcus pneumoniae biofilms*. J Bacteriol, 2007. **189**(5): p. 2030-8.
 69. Boles, B.R., M. Thoendel, and P.K. Singh, *Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(47): p. 16630-5.
 70. Deziel, E., Y. Comeau, and R. Villemur, *Initiation of biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities*. J Bacteriol, 2001. **183**(4): p. 1195-204.
 71. Yarwood, J.M., et al., *Generation of virulence factor variants in Staphylococcus aureus biofilms*. J Bacteriol, 2007. **189**(22): p. 7961-7.
 72. van der Veen, S. and T. Abee, *Generation of variants in Listeria monocytogenes continuous-flow biofilms is dependent on radical-induced DNA damage and RecA-mediated repair*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28590.
 73. Regev-Yochay, G., et al., *SpxB is a suicide gene of Streptococcus pneumoniae and*

- confers a selective advantage in an in vivo competitive colonization model. J Bacteriol*, 2007. **189**(18): p. 6532-9.
74. Garcia-Sanchez, S., et al., *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot Cell*, 2004. **3**(2): p. 536-45.
 75. Kreth, J., et al., *Characterization of hydrogen peroxide-induced DNA release by Streptococcus sanguinis and Streptococcus gordonii*. *J Bacteriol*, 2009. **191**(20): p. 6281-91.
 76. Itzek, A., et al., *Hydrogen peroxide-dependent DNA release and transfer of antibiotic resistance genes in Streptococcus gordonii*. *Journal of Bacteriology*, 2011. **193**(24): p. 6912-6922.
 77. Li, Y.-H., et al., *Natural genetic transformation of Streptococcus mutans growing in biofilms*. *Journal of Bacteriology*, 2001. **183**(3): p. 897-908.
 78. Henle, E.S. and S. Linn, *Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(31): p. 19095-8.
 79. Zheng, L., et al., *Catabolite control protein A controls hydrogen peroxide production and cell death in Streptococcus sanguinis*. *Journal of Bacteriology*, 2011. **193**(2): p. 516-526.
 80. Mai-Prochnow, A., et al., *Hydrogen peroxide linked to lysine oxidase activity facilitates biofilm differentiation and dispersal in several gram-negative bacteria*. *J Bacteriol*, 2008. **190**(15): p. 5493-501.
 81. Mai-Prochnow, A., et al., *Ecological advantages of autolysis during the development and dispersal of Pseudoalteromonas tunicata biofilms*. *Appl Environ Microbiol*, 2006. **72**(8): p. 5414-20.
 82. Barraud, N., et al., *Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 2006. **188**(21): p. 7344-53.
 83. Borriello, G., et al., *Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of Pseudomonas aeruginosa in biofilms*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. **48**(7): p. 2659-64.
 84. Werner, E., et al., *Stratified growth in Pseudomonas aeruginosa biofilms*. *Appl Environ Microbiol*, 2004. **70**(10): p. 6188-96.
 85. Peter, K., *Unifying mechanism for bacterial cell signalers (4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione, lactones and oligopeptides): Electron transfer and reactive oxygen species. Practical medical features*. *Medical Hypotheses*, 2007. **69**(5): p. 1105-1110.
 86. Abee, T., et al., *Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria*. *Curr Opin Biotechnol*, 2011. **22**(2): p. 172-9.
 87. Rothfork, J.M., et al., *Inactivation of a bacterial virulence pheromone by phagocyte-derived oxidants: new role for the NADPH oxidase in host defense*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(38): p. 13867-72.
 88. Ohsawa, T., et al., *Superoxide stress decreases expression of srfA through inhibition of transcription of the comQXP quorum-sensing locus in Bacillus subtilis*. *J Biochem*, 2006. **139**(2): p. 203-11.
 89. Frey, R.L., et al., *Reaction of N-acylhomoserine lactones with hydroxyl radicals: rates, products, and effects on signaling activity*. *Environ Sci Technol*, 2010. **44**(19): p. 7465-9.
 90. Hassett, D.J., et al., *Quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa controls*

- expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide.* Mol Microbiol, 1999. **34**(5): p. 1082-93.
91. Joelsson, A., B. Kan, and J. Zhu, *Quorum sensing enhances the stress response in Vibrio cholerae.* Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(11): p. 3742-6.
 92. Pontes, M.H., et al., *Quorum sensing primes the oxidative stress response in the insect endosymbiont, Sodalis glossinidius.* PLoS One, 2008. **3**(10): p. e3541.
 93. Uzureau, S., et al., *Global analysis of quorum sensing targets in the intracellular pathogen Brucella melitensis 16 M.* J Proteome Res, 2010. **9**(6): p. 3200-17.
 94. Srivastava, M., et al., *A selenium-dependent xanthine dehydrogenase triggers biofilm proliferation in Enterococcus faecalis through oxidant production.* J Bacteriol, 2011. **193**(7): p. 1643-52.
 95. Ramsey, M.M. and M. Whiteley, *Polymicrobial interactions stimulate resistance to host innate immunity through metabolite perception.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(5): p. 1578-1583.
 96. Domka, J., J. Lee, and T.K. Wood, *YliH (BssR) and YceP (BssS) regulate Escherichia coli K-12 biofilm formation by influencing cell signaling.* Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(4): p. 2449-59.
 97. Lee, J., A. Jayaraman, and T.K. Wood, *Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA.* BMC Microbiol, 2007. **7**: p. 42.
 98. Ren, D., et al., *Gene expression in Escherichia coli biofilms.* Appl Microbiol Biotechnol, 2004. **64**(4): p. 515-24.
 99. Zheng, M., et al., *DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the Escherichia coli response to hydrogen peroxide.* J Bacteriol, 2001. **183**(15): p. 4562-70.
 100. Garbe, T.R., M. Kobayashi, and H. Yukawa, *Indole-inducible proteins in bacteria suggest membrane and oxidant toxicity.* Arch Microbiol, 2000. **173**(1): p. 78-82.
 101. Kuczyńska-Wisnik, D., et al., *Antibiotics promoting oxidative stress inhibit formation of Escherichia coli biofilm via indole signalling.* Res Microbiol, 2010. **161**(10): p. 847-53.
 102. Martino, P.D., et al., *Indole can act as an extracellular signal to regulate biofilm formation of Escherichia coli and other indole-producing bacteria.* Can J Microbiol, 2003. **49**(7): p. 443-9.
 103. Bitoun, J.P., et al., *Transcriptional repressor Rex is involved in regulation of oxidative stress response and biofilm formation by Streptococcus mutans.* FEMS Microbiol Lett, 2011. **320**(2): p. 110-7.
 104. Wen, Z.T., et al., *Trigger factor in Streptococcus mutans is involved in stress tolerance, competence development, and biofilm formation.* Infect Immun, 2005. **73**(1): p. 219-25.
 105. Hodges, A.P., et al., *Bayesian network expansion identifies new ROS and biofilm regulators.* PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9513.
 106. Fields, J.A. and S.A. Thompson, *Campylobacter jejuni CsrA mediates oxidative stress responses, biofilm formation, and host cell invasion.* J Bacteriol, 2008. **190**(9): p. 3411-6.
 107. Yan, Q. and N. Wang, *The ColR/ColS two-component system plays multiple roles in the pathogenicity of the citrus canker pathogen Xanthomonas citri subsp. citri.* Journal of Bacteriology, 2011. **193**(7): p. 1590-1599.

108. Choi, K.S., et al., *Effect of gacS and gacA mutations on colony architecture, surface motility, biofilm formation and chemical toxicity in Pseudomonas sp. KL28*. J Microbiol, 2007. **45**(6): p. 492-8.
109. Danese, P.N., et al., *The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within Escherichia coli biofilms*. Mol Microbiol, 2000. **37**(2): p. 424-32.
110. Hennequin, C. and C. Forestier, *oxyR, a LysR-type regulator involved in Klebsiella pneumoniae mucosal and abiotic colonization*. Infect Immun, 2009. **77**(12): p. 5449-57.
111. Shanks, R.M., et al., *A Serratia marcescens OxyR homolog mediates surface attachment and biofilm formation*. J Bacteriol, 2007. **189**(20): p. 7262-72.
112. Honma, K., et al., *The OxyR homologue in Tannerella forsythia regulates expression of oxidative stress responses and biofilm formation*. Microbiology, 2009. **155**(Pt 6): p. 1912-22.
113. Seib, K.L., et al., *Characterization of the OxyR regulon of Neisseria gonorrhoeae*. Mol Microbiol, 2007. **63**(1): p. 54-68.

Figure Legends

Fig.1 Regulatory role of H₂O₂/ROS in the development of yeast colony

Below: Development of *S. cerevisiae* colony, which passes through 1st acidic, alkali and 2nd acidic. Above: Periods of hypothesized H₂O₂ and ROS involvement in the regulation of colony development. Colonies were photographed with a Hitachi HV-C20 color camera with Cosmical lenses, Kaiser Prolite illumination system and NIS Elements software (Laboratory Imaging).

Fig.2 Hypothesis on the effect of H₂O₂ balance on induction of ammonia signaling

Left: Predictions of changes in H₂O₂ concentration in cytosol and mitochondria of wild type and three oxidative-stress-defense-deficient strains based on reactions catalyzed by three main stress defense enzymes, cytosolic and mitochondrial superoxide dismutase Sod1p and Sod2p, respectively, and cytosolic catalase Ctt1p. Orange arrows indicate predicted H₂O₂ gradient between mitochondria and cytosol in wild-type strain and the three mutants. H₂O₂ gradient in wild type cells is proposed on the basis of the prediction that mitochondria are the major site of ROS production in starving respiring cells from acidic-phase colonies. Right: The balances compare the mitochondrial-cytosolic H₂O₂-homeostasis of the particular mutant strain and the wt colony. The H₂O₂ imbalance towards the higher H₂O₂ concentration in the cytosol abolishes the induction of ammonia signaling and proper colony development and differentiation.

Fig.3 Inputs and outputs of ROS production in biofilms

Left: Summary of processes inducing ROS production. Right: Processes affected by ROS.

Figure 1

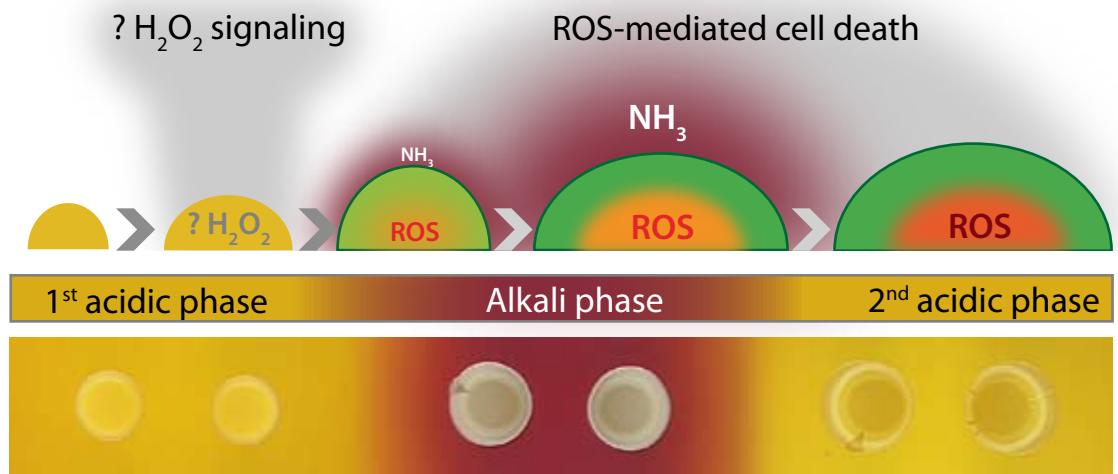


Figure 2

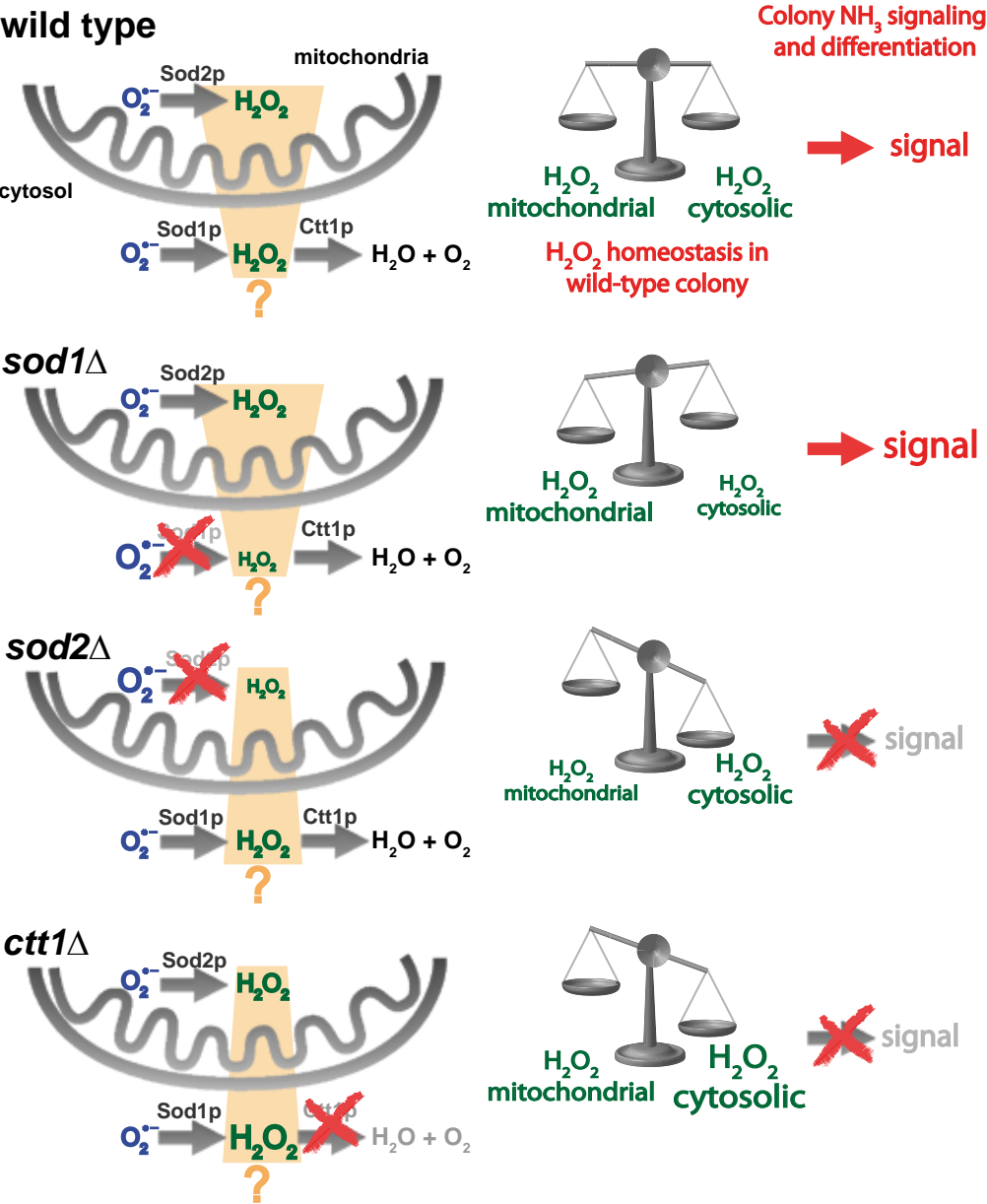
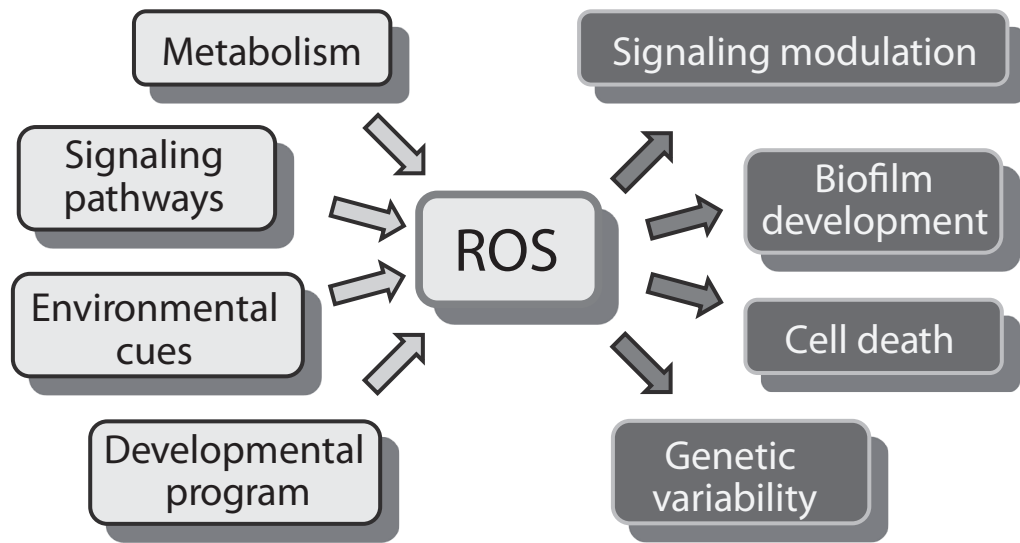


Figure 3



6 Diskuze

6.1 Diferenciace kvasinkové kolonie v horizontálním směru

Předchozí výsledky, zejména analýza transkriptomu metodou microarrays, naznačily možnou úlohu genů stresové odpovědi při vývoji kolonie. To, že tyto geny jsou účastny při stárnutí kolonie, není nikterak překvapivé, neboť jejich úloha při procesu stárnutí u kvasinek byla již popsána. Poněkud překvapivé bylo, že exprese těchto genů klesá s tím, jak kolonie stárne. Proto jsme se rozhodli hlouběji se zabývat úlohou genů stresové odpovědi při vývoji a stárnutí kolonie. Pro toto studium jsme použili kmeny deletované v zásadních genech antioxidantní ochrany *sod1Δ*, *sod2Δ* a *ctt1Δ*, deletované v genech pro cytosolickou a mitochondriální superoxid dismutasu a cytosolickou katalasu. Navázal jsem na předchozí práci (VACHOVA a PALKOVA, 2005), která ukázala, že jsou rozdíly mezi okrajem a středem kolonie co do počtu mrtvých buněk a buněk vykazujících markery programované buněčné smrti (viz Literární úvod). Tyto rozdíly pozorované u rodičovského kmene byly mnohem méně patrné u kmene s delecí genu *SOK2*, který zároveň není schopen alkalizace a produkce amoniaku (VACHOVA, *et al.*, 2004; VACHOVA a PALKOVA, 2005). Vyvstala hypotéza, že porušení produkce amoniaku vede ke ztrátě diferenciace a zhoršenému přežívání buněk na okraji kolonie, což může vést až ke zhoršenému přežívání kolonie jako celku.

Prezentované výsledky týkající se rozdílů v buněčné fyziologii mezi středem a okrajem kolonie (horizontální diferenciace) potvrzují důležitost alkalizace média v určité fázi růstu a/nebo produkce amoniaku jako potenciální signální molekuly pro tento typ diferenciace. Kmeny *sod1Δ*, *sod2Δ* a *ctt1Δ* vykazují velice podobný defekt na buněčné úrovni. Jsou citlivé k oxidativnímu stresu a dalším stresům. Na úrovni kolonií je však rozdíl mezi těmito dvěma kmeny poměrně značný. Kmen *sod1Δ* tvoří kolonie, které se fenotypicky velice podobají rodičovskému kmeni. Alkalická fáze růstu kolonie nastupuje ve stejný čas a se stejnou intenzitou jako u rodičovského kmene, stejně jako produkce plynného amoniaku. Zároveň jsou si kolonie obou kmenů podobné co se týče diferenciace mezi okrajem a středem kolonie. Naproti tomu kmen *sod2Δ* není schopen

produkce amoniaku a vstupu do alkalické fáze růstu a také diferenciaci kolonie neprobíhá stejným způsobem jako u rodičovského kmene. Především jsou zde menší rozdíly mezi středem a okrajem kolonie ve sledovaných faktorech. Ve středu kolonie je menší počet umírajících buněk a na okraji kolonie je naopak větší počet mrtvých buněk. Absence buněčné smrti ve středu kolonie má zřejmě za následek menší šanci na přežití pro buňky na okraji kolonie. Kolonie kmene *ctt1Δ* jsou jak v produkci amoniaku, tak v diferenciaci ve sledovaných znacích někde mezi fenotypem kolonií rodičovského kmene a kmene *sod2Δ*.

Potvrzuje se zde tedy hypotéza, že alkalizace média prostřednictvím amoniaku vede k diferenciaci. Snížení nebo úplná absence produkce amoniaku a s tím spojená nižší alkalizace, tak jak byla pozorována u kolonií *ctt1Δ* (snížení) a *sok2Δ* a *sod2Δ* (absence) vede ke mírnějšímu (*ctt1Δ*) nebo závažnějšímu (*sok2Δ*, *sod2Δ*) defektu v horizontální diferenciaci kolonie.

Vyvstává otázka, proč se kolonie kmenů postrádajících podobné buněčné funkce, chovají tak rozdílně. Delece genu pro cytosolickou superoxid dismutasu má malý dopad na vývoj kolonie zatímco absence stejné enzymové aktivity v mitochondriích (*sod2Δ*) vede k narušení normálního vývoje kolonie. Je známo, že delece různých genů oxidativní ochrany vede k jiným druhům oxidativního poškození na jiných místech buňky, podle toho kde a jak daný enzym působí. Například absence Sod1p i Sod2p vedou k oxidativnímu poškození mitochondriálních proteinů, ale v každém z kmenů je poškozena jiná sada proteinů (O'BRIEN, *et al.*, 2004). Jednou z možností tedy je, že specifické poškození některých buněčných komponent oxidativním stresem vede ke vstupu nebo naopak brání vstupu do alkalické fáze růstu a produkci amoniaku. Byly zkoumány i další deleční kmeny v genech oxidativní ochrany a bylo zjištěno, že většina ze zkoumaných kmenů má také problém s produkcí amoniaku a současně i s diferenciací, i když v tomto případě bylo sledováno mnohem méně markerů a mnohem méně podrobně. Zdá se tedy, že absence genů oxidativní ochrany vede obecně ke snížení diferenciaci, s výjimkou genu *SOD1*, jehož absence naopak zvyšuje diferenciaci i produkci amoniaku. Čím je tedy Sod1p specifický a čím se liší od jiných enzymů detoxikujících ROS?

Cytosolická superoxid dismutasa může hrát v buňce i jinou roli než jen antioxidantní ochranu. Například bylo zjištěno, že Sod1p se váže na napětím ovládaný mitochondriální kanál (VDAC – voltage dependent anion channel) a inhibuje jeho

funkci (KARACHITOS, *et al.*, 2009). V důsledku toho mitochondrie nemohou komunikovat s cytosolem, což má za následek snížení mitochondriálních funkcí, ale také snížení exportu mitochondriálně produkovaného superoxidu do cytosolu (HAN, *et al.*, 2003). To může ovlivnit buněčnou fyziologii nebo signalizaci a vést k alkalizaci.

Jiná, možná související, funkce pro Sod1p byla popsána u glukosové represe (SEHATI, *et al.*, 2011). Zdá se, že kmen *sod1Δ* neodpovídá správně na přítomnost glukosy a po vyčerpání glukosy u něj nebylo zaznamenáno diauxické přepnutí typické pro kultury, které vyčerpaly glukosu. Respirace je vysoká i za přítomnosti glukosy, která v rodičovském kmeni respiraci reprimuje. Zdá se tedy, že cytosolický superoxid hraje roli při ustavování glukosové represe. Deregulace mitochondriální aktivity by mohla mít dopad na kolonie před vstupem do alkalické fáze růstu, protože víme, že snížení mitochondriální aktivity je jedním z hlavních změn v koloniích v této fázi vývoje.

Kmen *sod1Δ* má v tekutých kulturách sklon akumulovat supresorové mutace, které mu pomáhají překonat defekt způsobený absencí této důležité antioxidantní aktivity. Tyto supresorové mutace byly dobře popsány, identifikovány a rozděleny do dvou skupin (LAPINSKAS, *et al.*, 1995; STRAIN, *et al.*, 1998): jedna skupina, která částečně suprimuje všechny defekty způsobené delecí *SOD1* (nazvaná *bsd* mutace – bypass of *sod1* deficiency) a druhá skupina, která suprimuje pouze defekty spojené s endogenní produkcí ROS (*seo* - Suppressors of Endogenous Oxygen Toxicity) jako je např. lysinová a methioninová auxotrofie kmene *sod1Δ* a nekompensuje např. citlivost kmene k endogenním oxidantům jako je paraquat. Tyto dva typy supresorových mutací je možné odlišit jako buňky resistantní k paraquatu (*bsd*) a buňky prototrofní na methionin (*seo* a *bsd*).

Vznikem supresorových mutací na okrajích kolonií by bylo možné vysvětlit zdánlivě paradoxní situaci kolonií kmene *sod1Δ*, které mají mnoho mrtvých a umírajících buněk ve středu kolonie, zatímco okraj kolonie je úplně zdravý. Zajímavé je, že ačkoliv se tyto mutace hojně vyskytují v tekutých kulturách, v koloniích jich bylo zaznamenáno pouze velmi malé množství. To by znamenalo, že buď v koloniích z nějakého důvodu tyto mutanty nemohou vznikat, nebo to, že koloniální prostředí prostě netlačí k vytvoření takových mutant například tím, že v prostředí kolonií by byl nižší oxidativní stres. Nicméně přestože nedochází k tvorbě výše popsaných supresorových mutací, k nějaké dědičné změně na okrajích kolonií *sod1Δ* dochází, protože buňky z tohoto regionu mají odlišné fyziologické parametry než původní kmen *sod1Δ* i než rodičovský kmen. Tato

změna fyziologie spočívá v neschopnosti tolerovat nízké pH při kultivaci v minimálním médiu a následné odumírání populace a také pH tohoto média během kultivace bylo mnohem vyšší než u rodičovského kmene. Je zajímavé, že původní kmen *sod1Δ* měl hodnotu pH média během kultivace dokonce nižší než rodičovský kmen. Pobyt v kolonii změněný kmen *sod1Δ* se tedy chová v tomto parametru zcela opačně než původní kmen *sod1Δ*. Jedná se o změnu, která přetrvává po mnoho generací. Pokud byly izolovány klony odvozené od jednotlivých buněk z kolonie, bylo možno pozorovat značnou heterogenitu ve sledovaném znaku (přežívání v médiu při tekuté kultivaci), která se zvyšovala se stářím kolonie, ze které byly klony izolovány.

Pozorovaná změna fyziologie může mít genetickou, nebo i epigenetickou podstatu. Pro první zmíněnou možnost hovoří fakt, že změněná fyziologie odvozeného *sod1Δ* kmene se udržuje po mnoho generací. Navíc u kmene *sod1Δ* byla pozorována dva až třikrát vyšší mutační rychlost než u rodičovského kmene (GRALLA a VALENTINE, 1991) a také zde dochází, jak již bylo zmíněno, k častému výskytu supresorových mutací. Pokud by se ale jednalo o mutaci, musela by vznikat se závratně vysokou rychlostí mnohokrát v jedné kolonii a poskytovat jejímu nositeli značnou selekční výhodu, protože starší kolonie jsou tvořeny z velké části buňkami s pozměněnou fyziologií. Navíc takto pozměněný fenotyp vznikal pravidelně a reprodukovatelně u velké části buněk v kolonii. To by znamenalo, že je v podmínkách kolonie silný selekční tlak na tvorbu těchto blíže nespecifikovaných mutací a že delece genu *SOD1*, pokud není kompenzována touto supresorovou mutací, vede k těžkému poškození fyziologie kolonií. Zároveň ovšem kolonie *sod1Δ* nenesly žádné znaky vysoké mutační rychlosti jako je vytváření sektorů nebo papil.

Vzhledem ke všem uvedeným argumentům se zdá genetická podmíněnost vzniku pozměněné varianty kmene *sod1Δ* v koloniích jako nepravděpodobná. Jinou možností je, že pozorované změny nejsou geneticky podložené, ale že se jedná o epigenetickou změnu, podobnou jako je „white-opaque“ přepnutí u *C. albicans* (LOHSE a JOHNSON, 2009). Pro tuto možnost hovoří četnost výskytu fenotypu (příliš časté na mutaci) a také heterogenita v intenzitě projevu sledovaného znaku (přežívání v minimálním médiu) mezi jednotlivými izolovanými klony. Podobná fenotypová heterogenita byla pozorována u kmene *sod1Δ* v souvislosti s resistencí k chemikáliím produkujícím ROS – paraquatem a menadiolem (SUMNER, *et al.*, 2003).

6.2 Diferenciace kvasinkové kolonie ve vertikálním směru

Kromě diferenciace v horizontálním směru mezi středem a okrajem kolonie jsme popsali ještě diferenciaci ve vertikálním směru tedy mezi buňkami v horní a spodní vrstvě kolonie, které jsme nazvaly U a L buňky (podle „upper“ a „lower“). Morfologické a fyziologické rozdíly mezi těmito dvěma typy buněk byly nalezeny ve velkém množství znaků, zejména pak v metabolismu a stresové resistenci. Buňky horní vrstvy (U buňky) byly resistantnější k nejrůznějším stresovým faktorům a také déle přežívaly v prostředí kolonie v porovnání s L buňkami.

Po morfologické stránce jsou U a L buňky dosti podobné dvou buněčným typům izolovaným Allenem a kolektivem (2006) ze stárnoucí tekuté kultury *S. cerevisiae* (viz Literární úvod). Také tito autoři nazvaly izolované subpopulace jako horní a spodní („upper“ a „lower“ - U a L) frakci po dělení buněk na Percollovém gradientu. Zde je třeba uvést drobné vysvětlení k terminologii, která může být trochu zavádějící, neboť subpopulace označené shodně U a L jsou v tomto případě zaměněné. Při dělení populace z tekuté kultury horní frakce (U) je ta, která má nižší vznášivou hustotu a po centrifugaci tvořila horní frakci, buňky dolní frakce (L) mají pak vyšší vznášivou hustotu. Naproti tomu buňky izolované námi jsou označené podle umístění v kolonii. Koloniální U buňky mají podobnou hodnotu vznášivé hustoty, akumulují glykogen, mají ztlustělou buněčnou stěnu a některé další znaky, díky nimž jsou podobnější L buňkám výše zmiňovaných autorů. Podobně koloniální L buňky jsou podobné U buňkám z tekutých kultur hodnotou vznášivé hustoty, vyšší produkcí ROS a nižší životaschopností. Jsou zde ale také významné rozdíly mezi koloniálními subpopulacemi a těmi z tekutých kultur. Allen a kolektiv nenalezli žádné významné rozdíly v expresi zejména metabolických genů a genů účastnících se translace, což je jedním z hlavních rozdílů popsanych v této práci u koloniálních subpopulací. Dále pak L buňky z tekuté kultury (které odpovídají koloniálním U buňkám) mají zvýšenou respiraci oproti U buňkám (DAVIDSON, *et al.*, 2011). V koloniích naopak L buňky mají zvýšenou respiraci, která byla naměřena jednak jako zvýšená konzumace kyslíku těmito buňkami a jednak také na transkripční úrovni indukci mitochondriálních genů.

Je tedy zřejmé, že diferenciace v tekutých kulturách a koloniích má možná některé společné mechanismy, které zajistí, že subpopulace vypadají podobně a mají i některé společné rysy. Nicméně metabolická diferenciace buněk v kolonii, která nebyla

pozorována v tekutých kulturách, může být unikátním jevem vyskytujícím se v koloniích díky jejich prostorovému uspořádání a možnému prostorovému oddělení různých subpopulací.

Expresní rozdíly mezi U a L buňkami v kolonii ukazují, že U buňky aktivují expresi množství genů pro proteiny účastníci se translace (z velké části ribozomální geny, ale i geny pro translační regulační faktory), glykolýzy a aminokyselinového metabolismu. Poslední jmenované jsou regulovány transkripčním faktorem Gcn4p, který je hlavním regulátorem aminokyselinového metabolismu u kvasinek. Exprese genů pod kontrolou Gcn4p byla popsána i u biofilmu *C. albicans* (GARCIA-SANCHEZ, *et al.*, 2004). Jeho aktivace je závislá na nedostatku aminokyselin a probíhá na úrovni iniciace translace a stability proteinu (HINNEBUSCH, 2005). Geny pro translační aparát a glykolýzu jsou úzce spjaty s přítomností živin a na nich závislým buněčným růstem a jsou regulovány drahami snímajícími přítomnost živin v prostředí (SMETS, *et al.*, 2010). Těmito drahami jsou především Ras/cAMP/PKA („protein kinase A“) dráha a TOR („target of rapamycin“) dráha, které obě indukují zmíněné geny při přítomnosti uhlíkatých i dusíkatých živin. Zdá se tedy, že U buňky aktivují tyto dráhy, nebo alespoň jednu z nich. TOR dráha je aktivována u kvasinek aminokyselinami, nejspíše pak glutaminem, který je hlavním mezičlánkem mezi dusíkatým a uhlíkatým metabolismem. Naměřená vysoká hladina glutaminu v U buňkách silně hovoří pro aktivní TOR dráhu v těchto buňkách. Naproti tomu PKA dráha, indukovaná především glukosou je spíše neaktivní v U buňkách protože (i) v médiu není žádná glukosa a (ii) U buňky vykazují výrazně horší přežívání v koloniích kmenů s delecí v genech *IRA2*, *SOK2* nebo *YAK1*, které jsou buď inhibitory PKA dráhy (*IRA2*), nebo jí jsou negativně regulovány (*YAK1* a *SOK2*) a fenotypově tak tyto deleční kmeny napodobují aktivovanou PKA dráhu (SMETS, *et al.*, 2010). Podle těchto nepřímých důkazů se zdá, že U buňky mají aktivní TOR dráhu a inaktivní PKA dráhu.

Dvě hlavní expresní charakteristiky U buněk, tedy současná aktivace aminokyselinového metabolismu a translace, ukazují, že v těchto buňkách dochází k současné aktivaci Gcn4p dráhy a TOR a/nebo PKA dráhy, což je v rozporu se známými fakty o těchto signalizačních drahách (CHERKASOVA a HINNEBUSCH, 2003; KUBOTA, *et al.*, 2003; VALENZUELA, *et al.*, 2001). Podle výsledků získaných v tekutých kulturách je translace Gcn4p přímo inhibována aktivní TOR nebo PKA dráhou. Také některé další charakteristiky U buněk, jako akumulace glykogenu a aktivní autofagie,

jsou v přímém rozporu se známými regulacemi (CEBOLLERO a REGGIORI, 2009; ZURITA-MARTINEZ a CARDENAS, 2005). Oba zmíněné procesy jsou inhibovány TOR a PKA dráhou. Jak tedy vysvětlit tyto rozpory? Jedno z možných vysvětlení spočívá v rozdílné aktivaci obou drah v U buňkách. Obě dráhy, PKA a TOR, jsou velmi úzce provázané a také výstupy jejich signalizace jsou podobné a bylo ukázáno, že aktivace jedné dráhy vede k aktivaci druhé (MARTIN, *et al.*, 2004; SCHMELZLE, *et al.*, 2004). Z toho vyplývá, že je velmi obtížné studovat tyto dráhy samostatně a efekty připisované jedné, nebo druhé dráze jsou ve skutečnosti výsledkem společné regulace obou drah. V experimentálních systémech používaných ke studiu regulačních drah se používají nejčastěji buňky exponenciálně rostoucí, u kterých je aktivace nebo inaktivace sledovaných drah navozena náhlým přemístěním do odlišných podmínek, nebo přidáním inhibitoru. To jsou podmínky zcela odlišné od našeho případu v koloniích, kde jsou aktivity těchto drah řízeny „přirozeněji“. To může být důvodem, že v U buňkách dojde k aktivaci jedné a inaktivaci druhé dráhy, což by mohlo mít za následek pozorované efekty. Například u autofagie, jejíž inhibice je za normálních okolností vnímána jako jeden z hlavních cílů TOR dráhy, bylo prokázáno, že pokud je neaktivní PKA dráha, dochází k aktivaci autofagie v buňkách i při aktivní TOR dráze (YANG, *et al.*, 2010). Přesně taková konstelace je předpokládána pro U buňky (viz výše). Podobné výsledky byly získány i pro regulaci syntézy glykogenu (SOULARD, *et al.*, 2010).

Co se týče Gcn4p, jeho translace, tedy hlavní regulační krok, je kontrolován kinasou Gcn2p (HINNEBUSCH, 2005). Je sice známo, že tato kinasa je přímo inhibována aktivní TOR kinasou, která je zas regulována hladinou aminokyselin převáděných na společnou „měnu“ – glutamin, ale zároveň je Gcn2p silně aktivována nenabitými tRNA. Ty se vyskytují i při hladovění jen na jednu aminokyselinu, na rozdíl od aktivace TOR dráhy, která spíše reaguje na hladinu dusíkatých sloučenin jako celku. Může tak nastat situace, kdy bude aktivní TOR dráha a přesto bude současně aktivní Gcn2p a Gcn4p.

Hlavní metabolickým rysem L buněk je zvýšená aktivita mitochondrií. Několik prací zabývajících se kyslíkem v koloniích a biofilmech shodně naměřilo výrazně sníženou až nulovou koncentraci kyslíku ve spodních částech kolonie nebo biofilmu (DE BEER, *et al.*, 1994; OKABE, *et al.*, 1999; RAMSING, *et al.*, 1993; RANI, *et al.*, 2007; SCHRAMM, *et al.*, 1996; XU, *et al.*, 1998). Anoxické prostředí je u *S. cerevisiae* výrazným signálem pro odbourávání mitochondrií a tvorbu neaktivních promitochondrií (ROSENFELD, *et al.*, 2004). Zvýšená respirativní kapacita a lokalizace ve spodní vrstvě kolonie je tedy ve

zdánlivém rozporu. Nicméně jsou zde dvě možná vysvětlení tohoto jevu. Jednak bylo nedávno popsáno nezávisle ve dvou pracích, že při růstu v chemostatu, a to specificky za velmi nízkých růstových rychlostí, dochází k indukci mitochondriálního respirativního metabolismu v hypoxických podmínkách (BOENDER, *et al.*, 2011; RINTALA, *et al.*, 2009). Tedy situace zcela opačná než u rychle rostoucích buněk. Buňky v kolonii rostou a dělí se pouze na okraji a v nejvrchnější vrstvě, což představuje u starších kolonií pouze zanedbatelné procento buněk. Zbytek buněk je nedělících a je proto bližší pomalu se dělícím buňkám ze zmiňovaných experimentů. Indukce respirativního metabolismu ve spodní vrstvě by tedy mohla dokonce být způsobena hypoxií. Druhá poznámka se týká způsobu, jakým je hypoxie nebo anoxie v hlubších místech biofilmu dosaženo. V úvodu jsem zmínil, že gradient malých molekul včetně kyslíku v koloniích je způsoben nikoli limitací jejich prostupnosti do hlubších míst kolonie, ale spíše konzumací těchto látek buňkami v horních vrstvách kolonie (STEWART a FRANKLIN, 2008). Pokud tedy budeme uvažovat metabolicky aktivní kolonii nebo biofilm metabolizující kyslík ve velké míře, můžeme očekávat anoxické prostředí ve spodních vrstvách. Takové uspořádání bylo použito pro většinu citovaných měření koncentrace kyslíku. Nicméně v koloniích, kde buňky horní vrstvy téměř nerostou a spotřebovávají malé množství kyslíku, je možné, že koncentrace kyslíku ve spodní vrstvě není významně snížena.

Podobně jako u horizontální diferenciaci, je i pro vertikální diferenciaci důležitá amoniaková signalizace. Amoniak indukuje jak vertikální, tak horizontální diferenciaci. Nicméně nejedná se o prostou závislost, jak je zřejmé z toho, že kolonie neschopné produkce amoniaku, jako například kolonie kmene *sok2Δ* nebo *sod2Δ*, tvoří normálně vrstvu U buněk, a to dokonce mocnější než rodičovský kmen. Nezodpovězenou otázkou zůstává, nakolik jsou U buňky těchto delečních kmenů fyziologicky a metabolicky podobné U buňkám rodičovského kmene.

Podle získaných dat byl navržen model vztahu mezi U a L buňkami. Hladovější a stresované L buňky podle něj poskytují živiny získané degradací vlastních buněčných komponent U buňkám v horní vrstvě kolonie. Je možné uvažovat i výměnu metabolitů mezi diferencovanými vrstvami podobně jako mezi orgány mnohobuněčného organismu probíhá látková výměna a recyklace substrátu (např. Coriho cyklus a NH_4^+ -glutaminový cyklus). Tato možnost je skutečně vzrušující, ale to, zda takovéto sofistikované přesuny metabolitů mezi buňkami skutečně probíhají, nebude jednoduché

prokázat.

Diferenciace kvasinkových kolonií je další ukázkou diferenciace mikrobiálních společenstev, jak jsem je popsal v úvodu této práce. Pokud bychom zkoumali dostatečně do hloubky, zřejmě bychom našli podobné případy diferenciace ve všech mnohobuněčných společenstvech, včetně zdánlivě homogenních třepaných tekutých kultur (viz Literární úvod). Stále jasněji se tak ukazuje, že diferenciace, původně považovaná za výlučnou charakteristiku mnohobuněčných organismů, je také základní charakteristikou mikroorganismů.

8 Závěr

Tato práce se zabývá vývojem, fyziologií, regulací a genetickou podmíněností vývoje a diferenciací kolonií *S. cerevisiae*. Výsledky prezentované v předkládané práci rozšiřují znalosti o diferenciaci kvasinkových kolonií na vyšší úroveň. Nejdůležitější poznatky z této práce se dají shrnout do následujících bodů:

- Potvrdil jsem, že horizontální diferenciací kolonie je závislá na schopnosti produkovat amoniak a alkalizovat médium a je málo závislá na buněčných kapacitách pro odstraňování ROS. Potvrdil jsem tak domněnku, že amoniakový signál je důležitý pro indukci buněčné smrti ve středu kolonie, čímž získají buňky na okraji kolonie živiny pro další přežití. Prospěch tím získá populace jako celek. Fenotypy kolonií kmenů s delecí v různých genech pro enzymy odstraňující ROS naznačují možnost regulace produkce amoniaku pomocí ROS.
- Popsal jsem společně s kolegy zcela nový typ diferenciací v kvasinkové kolonii – vertikální rozdělení na horní a spodní vrstvu, které jsou tvořené dvěma fyziologicky a metabolicky zcela rozdílnými populacemi buněk.
- Subpopulace buněk horní a spodní vrstvy se mi podařilo separovat a charakterizovat po stránce morfologické, transkriptomové, metabolické a stresově rezistenční.
- V přehledném článku jsem, pokud vím, poprvé shrnul dostupné literární zdroje týkající se úlohy ROS v mikrobiálních biofilmech a koloniích. Jedná se o málo probádanou oblast, kde bylo, zejména v posledních několika letech, učiněno několik zajímavých objevů, které jistě stojí za pozornost.

9 Seznam použité literatury

- Alem, M. A., Oteef, M. D., Flowers, T. H. a Douglas, L. J. (2006). Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryot Cell* 5, 1770-1779.
- Allegrucci, M. a Sauer, K. (2007). Characterization of colony morphology variants isolated from *Streptococcus pneumoniae* biofilms. *J Bacteriol* 189, 2030-2038.
- Allen, C., Buttner, S., Aragon, A. D., Thomas, J. A., Meirelles, O., Jaetao, J. E., Benn, D., Ruby, S. W., Veenhuis, M., Madeo, F. a Werner-Washburne, M. (2006). Isolation of quiescent and nonquiescent cells from yeast stationary-phase cultures. *J Cell Biol* 174, 89-100.
- Allewalt, J. P., Bateson, M. M., Revsbech, N. P., Slack, K. a Ward, D. M. (2006). Effect of temperature and light on growth of and photosynthesis by *Synechococcus isolates* typical of those predominating in the octopus spring microbial mat community of Yellowstone National Park. *Appl Environ Microbiol* 72, 544-550.
- Avery, S. V. (2006). Microbial cell individuality and the underlying sources of heterogeneity. *Nat Rev Microbiol* 4, 577-587.
- Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L. a Leibler, S. (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* 305, 1622-1625.
- Banin, E., Vasil, M. L. a Greenberg, E. P. (2005). Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11076-11081.
- Barraud, N., Hassett, D. J., Hwang, S. H., Rice, S. A., Kjelleberg, S. a Webb, J. S. (2006). Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188, 7344-7353.
- Baty, A. M., 3rd, Eastburn, C. C., Diwu, Z., Techarnjanaruk, S., Goodman, A. E. a Geesey, G. G. (2000). Differentiation of chitinase-active and non-chitinase-active subpopulations of a marine bacterium during chitin degradation. *Appl Environ Microbiol* 66, 3566-3573.
- Benbadis, L., Cot, M., Rigoulet, M. a Francois, J. (2009). Isolation of two cell populations from yeast during high-level alcoholic fermentation that resemble quiescent and nonquiescent cells from the stationary phase on glucose. *FEMS Yeast Res* 9, 1172-1186.
- Bigger, J. W. (1944). Treatment of staphylococcal infections with penicillin. *The Lancet* 244, 497-500.

- Boender, L. G., van Maris, A. J., de Hulster, E. A., Almering, M. J., van der Klei, I. J., Veenhuis, M., de Winde, J. H., Pronk, J. T. a Daran-Lapujade, P. (2011). Cellular responses of *Saccharomyces cerevisiae* at near-zero growth rates: transcriptome analysis of anaerobic retentostat cultures. *FEMS Yeast Res* *11*, 603-620.
- Boles, B. R. a Horswill, A. R. (2008). Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog* *4*, e1000052.
- Boles, B. R., Thoendel, M. a Singh, P. K. (2004). Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 16630-16635.
- Booth, I. R. (2002). Stress and the single cell: intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *Int J Food Microbiol* *78*, 19-30.
- Bruckner, S. a Mosch, H. U. (2012). Choosing the right lifestyle: adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* *36*, 25-58.
- Busuioc, M., Buttaró, B. A. a Piggot, P. J. (2010). The pdh operon is expressed in a subpopulation of stationary-phase bacteria and is important for survival of sugar-starved *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* *192*, 4395-4402.
- Cebollero, E. a Reggiori, F. (2009). Regulation of autophagy in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* *1793*, 1413-1421.
- Davidson, G. S., Joe, R. M., Roy, S., Meirelles, O., Allen, C. P., Wilson, M. R., Tapia, P. H., Manzanilla, E. E., Dodson, A. E., Chakraborty, S., Carter, M., Young, S., Edwards, B., Sklar, L. a Werner-Washburne, M. (2011). The proteomics of quiescent and nonquiescent cell differentiation in yeast stationary-phase cultures. *Mol Biol Cell* *22*, 988-998.
- Davies, J., Spiegelman, G. B. a Yim, G. (2006). The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr Opin Microbiol* *9*, 445-453.
- de Beer, D., Stoodley, P., Roe, F. a Lewandowski, Z. (1994). Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol Bioeng* *43*, 1131-1138.
- de Kievit, T. R. (2009). Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ Microbiol* *11*, 279-288.
- Deighton, M. a Borland, R. (1993). Regulation of slime production in *Staphylococcus epidermidis* by iron limitation. *Infect Immun* *61*, 4473-4479.
- Derengowski, L. S., De-Souza-Silva, C., Braz, S. V., Mello-De-Sousa, T. M., Bao, S. N., Kyaw, C. M. a Silva-Pereira, I. (2009). Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* *8*, 13.

- Dobinsky, S., Kiel, K., Rohde, H., Bartscht, K., Knobloch, J. K., Horstkotte, M. A. a Mack, D. (2003). Glucose-related dissociation between *icaADBC* transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesin synthesis. *J Bacteriol* *185*, 2879-2886.
- Dowell, P., Affas, Z., Reynolds, C., Holden, M. T., Wood, S. J., Saint, S., Cockayne, A., Hill, P. J., Dodd, C. E., Bycroft, B. W., Chan, W. C. a Williams, P. (2001). Structure, activity and evolution of the group I thiolactone peptide quorum-sensing system of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* *41*, 503-512.
- Dubnau, D. a Losick, R. (2006). Bistability in bacteria. *Mol Microbiol* *61*, 564-572.
- Elowitz, M. B., Levine, A. J., Siggia, E. D. a Swain, P. S. (2002). Stochastic gene expression in a single cell. *Science* *297*, 1183-1186.
- Engelberg, D., Mimran, A., Martinetto, H., Otto, J., Simchen, G., Karin, M. a Fink, G. R. (1998). Multicellular stalk-like structures in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* *180*, 3992-3996.
- Ferrell, J. E., Jr. (2002). Self-perpetuating states in signal transduction: positive feedback, double-negative feedback and bistability. *Curr Opin Cell Biol* *14*, 140-148.
- Fichtner, L., Schulze, F. a Braus, G. H. (2007). Differential Flo8p-dependent regulation of *FLO1* and *FLO11* for cell-cell and cell-substrate adherence of *S. cerevisiae* S288c. *Mol Microbiol* *66*, 1276-1289.
- Furukawa, S., Nojima, N., Yoshida, K., Hirayama, S., Ogihara, H. a Morinaga, Y. (2011). The importance of inter-species cell-cell co-aggregation between *Lactobacillus plantarum* ML11-11 and *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 in mixed-species biofilm formation. *Biosci Biotechnol Biochem* *75*, 1430-1434.
- Gallaher, T. K., Wu, S., Webster, P. a Aguilera, R. (2006). Identification of biofilm proteins in non-typeable *Haemophilus Influenzae*. *BMC Microbiol* *6*, 65.
- Garcia-Sanchez, S., Aubert, S., Iraqui, I., Janbon, G., Ghigo, J. M. a d'Enfert, C. (2004). *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot Cell* *3*, 536-545.
- Gerstel, U. a Romling, U. (2003). The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella typhimurium*. *Res Microbiol* *154*, 659-667.
- Ghosh, S., Kebaara, B. W., Atkin, A. L. a Nickerson, K. W. (2008). Regulation of aromatic alcohol production in *Candida albicans*. *Appl Environ Microbiol* *74*, 7211-7218.

- Gjermansen, M., Ragas, P., Sternberg, C., Molin, S. a Tolker-Nielsen, T. (2005). Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environ Microbiol* 7, 894-906.
- Gonzalez-Pastor, J. E., Hobbs, E. C. a Losick, R. (2003). Cannibalism by sporulating bacteria. *Science* 301, 510-513.
- Gralla, E. B. a Valentine, J. S. (1991). Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu,Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates. *J Bacteriol* 173, 5918-5920.
- Han, D., Antunes, F., Canali, R., Rettori, D. a Cadenas, E. (2003). Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem* 278, 5557-5563.
- Hancock, V. a Klemm, P. (2007). Global gene expression profiling of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* during biofilm growth in human urine. *Infect Immun* 75, 966-976.
- Hansen, S., Lewis, K. a Vulic, M. (2008). Role of global regulators and nucleotide metabolism in antibiotic tolerance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 2718-2726.
- Hawser, S. P. a Douglas, L. J. (1994). Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun* 62, 915-921.
- Hermelink, A., Brauer, A., Lasch, P. a Naumann, D. (2009). Phenotypic heterogeneity within microbial populations at the single-cell level investigated by confocal Raman microspectroscopy. *Analyst* 134, 1149-1153.
- Hinnebusch, A. G. (2005). Translational regulation of *GCN4* and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol* 59, 407-450.
- Hinsa, S. M., Espinosa-Urgel, M., Ramos, J. L. a O'Toole, G. A. (2003). Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Mol Microbiol* 49, 905-918.
- Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., MacCoss, M. J., Zhang, Z., Jones, R. A. a Miller, S. I. (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* 436, 1171-1175.
- Hornby, J. M., Jensen, E. C., Lisec, A. D., Tasto, J. J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P. a Nickerson, K. W. (2001). Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol* 67, 2982-2992.

- Hu, Y. a Coates, A. R. (2005). Transposon mutagenesis identifies genes which control antimicrobial drug tolerance in stationary-phase *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 243, 117-124.
- Chai, Y., Chu, F., Kolter, R. a Losick, R. (2008). Bistability and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 67, 254-263.
- Chandra, J., Kuhn, D. M., Mukherjee, P. K., Hoyer, L. L., McCormick, T. a Ghannoum, M. A. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* 183, 5385-5394.
- Chen, H. a Fink, G. R. (2006). Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev* 20, 1150-1161.
- Chen, H., Fujita, M., Feng, Q., Clardy, J. a Fink, G. R. (2004). Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5048-5052.
- Cherkasova, V. A. a Hinnebusch, A. G. (2003). Translational control by TOR and *TAP42* through dephosphorylation of eIF2alpha kinase *GCN2*. *Genes Dev* 17, 859-872.
- Choo-Smith, L. P., Maquelin, K., van Vreeswijk, T., Bruining, H. A., Puppels, G. J., Ngo Thi, N. A., Kirschner, C., Naumann, D., Ami, D., Villa, A. M., Orsini, F., Doglia, S. M., Lamfarraj, H., Sockalingum, G. D., Manfait, M., Allouch, P. a Endtz, H. P. (2001). Investigating microbial (micro)colony heterogeneity by vibrational spectroscopy. *Appl Environ Microbiol* 67, 1461-1469.
- Jackson, D. W., Simecka, J. W. a Romeo, T. (2002). Catabolite repression of *Escherichia coli* biofilm formation. *J Bacteriol* 184, 3406-3410.
- Jayaraman, A. a Wood, T. K. (2008). Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annu Rev Biomed Eng* 10, 145-167.
- Joseph, C. M. L., Kumar, G., Su, E. a Bisson, L. F. (2007). Adhesion and biofilm production by wine isolates of *Brettanomyces bruxellensis*. *American Journal of Enology and Viticulture* 58, 373-378.
- Karachitos, A., Galganska, H., Wojtkowska, M., Budzinska, M., Stobienia, O., Bartosz, G. a Kmita, H. (2009). Cu,Zn-superoxide dismutase is necessary for proper function of VDAC in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *FEBS Lett* 583, 449-455.
- Karatan, E., Duncan, T. R. a Watnick, P. I. (2005). NspS, a predicted polyamine sensor, mediates activation of *Vibrio cholerae* biofilm formation by norspermidine. *J Bacteriol* 187, 7434-7443.
- Karatan, E. a Watnick, P. (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* 73, 310-347.

- Kawarai, T., Furukawa, S., Ogihara, H. a Yamasaki, M. (2007). Mixed-species biofilm formation by lactic acid bacteria and rice wine yeasts. *Appl Environ Microbiol* 73, 4673-4676.
- Kearns, D. B. a Losick, R. (2005). Cell population heterogeneity during growth of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* 19, 3083-3094.
- Kelly, C. D. a Rahn, O. (1932). The growth rate of individual bacterial cells. *J Bacteriol* 23, 147-153.
- Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N. a Lewis, K. (2004). Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186, 8172-8180.
- Kierek, K. a Watnick, P. I. (2003). Environmental determinants of *Vibrio cholerae* biofilm development. *Appl Environ Microbiol* 69, 5079-5088.
- Kirisits, M. J., Prost, L., Starkey, M. a Parsek, M. R. (2005). Characterization of colony morphology variants isolated from *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 71, 4809-4821.
- Kirov, S. M., Webb, J. S., O'May C, Y., Reid, D. W., Woo, J. K., Rice, S. A. a Kjelleberg, S. (2007). Biofilm differentiation and dispersal in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Microbiology* 153, 3264-3274.
- Klausen, M., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S. a Tolker-Nielsen, T. (2003a). Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol* 50, 61-68.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S. a Tolker-Nielsen, T. (2003b). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* 48, 1511-1524.
- Konopka, M. C., Strovas, T. J., Ojala, D. S., Chistoserdova, L., Lidstrom, M. E. a Kalyuzhnaya, M. G. (2011). Respiration response imaging for real-time detection of microbial function at the single-cell level. *Appl Environ Microbiol* 77, 67-72.
- Kubota, H., Obata, T., Ota, K., Sasaki, T. a Ito, T. (2003). Rapamycin-induced translational derepression of *GCN4* mRNA involves a novel mechanism for activation of the eIF2 alpha kinase *GCN2*. *J Biol Chem* 278, 20457-20460.
- Kussell, E. a Leibler, S. (2005). Phenotypic diversity, population growth, and information in fluctuating environments. *Science* 309, 2075-2078.
- LaFleur, M. D., Kumamoto, C. A. a Lewis, K. (2006). *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 3839-3846.

- Lapinskas, P. J., Cunningham, K. W., Liu, X. F., Fink, G. R. a Culotta, V. C. (1995). Mutations in PMR1 suppress oxidative damage in yeast cells lacking superoxide dismutase. *Mol Cell Biol* *15*, 1382-1388.
- Lee, J., Jayaraman, A. a Wood, T. K. (2007). Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. *BMC Microbiol* *7*, 42.
- Lewis, R. E., Lo, H. J., Raad, II a Kontoyiannis, D. P. (2002). Lack of catheter infection by the *efg1/efg1 cph1/cph1* double-null mutant, a *Candida albicans* strain that is defective in filamentous growth. *Antimicrob Agents Chemother* *46*, 1153-1155.
- Lim, Y., Jana, M., Luong, T. T. a Lee, C. Y. (2004). Control of glucose- and NaCl-induced biofilm formation by *rbf* in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* *186*, 722-729.
- Liu, X., Ramsey, M. M., Chen, X., Koley, D., Whiteley, M. a Bard, A. J. (2011). Real-time mapping of a hydrogen peroxide concentration profile across a polymicrobial bacterial biofilm using scanning electrochemical microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 2668-2673.
- Lohse, M. B. a Johnson, A. D. (2009). White-opaque switching in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* *12*, 650-654.
- Lopez, D., Vlamakis, H. a Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *2*, a000398.
- Madeo, F., Frohlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S. J., Wolf, D. H. a Frohlich, K. U. (1999). Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J Cell Biol* *145*, 757-767.
- Mai-Prochnow, A., Evans, F., Dalisay-Saludes, D., Stelzer, S., Egan, S., James, S., Webb, J. S. a Kjelleberg, S. (2004). Biofilm development and cell death in the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Appl Environ Microbiol* *70*, 3232-3238.
- Mai-Prochnow, A., Lucas-Elio, P., Egan, S., Thomas, T., Webb, J. S., Sanchez-Amat, A. a Kjelleberg, S. (2008). Hydrogen peroxide linked to lysine oxidase activity facilitates biofilm differentiation and dispersal in several Gram-negative bacteria. *J Bacteriol* *190*, 5493-5501.
- Martin, D. E., Soulard, A. a Hall, M. N. (2004). TOR regulates ribosomal protein gene expression via PKA and the Forkhead transcription factor *FHL1*. *Cell* *119*, 969-979.
- Martineau, C. N., Beckerich, J. M. a Kabani, M. (2007). Flo11p-independent control of "mat" formation by hsp70 molecular chaperones and nucleotide exchange factors in yeast. *Genetics* *177*, 1679-1689.

- Martinez, L. R. a Casadevall, A. (2006). Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 1021-1033.
- Martinez, L. R. a Casadevall, A. (2007). *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. *Appl Environ Microbiol* 73, 4592-4601.
- Martino, P. D., Fursy, R., Bret, L., Sundararaju, B. a Phillips, R. S. (2003). Indole can act as an extracellular signal to regulate biofilm formation of *Escherichia coli* and other indole-producing bacteria. *Can J Microbiol* 49, 443-449.
- Mateus, C., Crow, S. A., Jr. a Ahearn, D. G. (2004). Adherence of *Candida albicans* to silicone induces immediate enhanced tolerance to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 3358-3366.
- Mathee, K., Ciofu, O., Sternberg, C., Lindum, P. W., Campbell, J. I., Jensen, P., Johnsen, A. H., Givskov, M., Ohman, D. E., Molin, S., Hoiby, N. a Kharazmi, A. (1999). Mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology* 145 (Pt 6), 1349-1357.
- Matthysse, A. G., Yarnall, H. A. a Young, N. (1996). Requirement for genes with homology to ABC transport systems for attachment and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 178, 5302-5308.
- McCool, J. D., Long, E., Petrosino, J. F., Sandler, H. A., Rosenberg, S. M. a Sandler, S. J. (2004). Measurement of SOS expression in individual *Escherichia coli* K-12 cells using fluorescence microscopy. *Mol Microbiol* 53, 1343-1357.
- McEllistrem, M. C., Ransford, J. V. a Khan, S. A. (2007). Characterization of in vitro biofilm-associated pneumococcal phase variants of a clinically relevant serotype 3 clone. *J Clin Microbiol* 45, 97-101.
- Meunier, J. R. a Choder, M. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* colony growth and ageing: biphasic growth accompanied by changes in gene expression. *Yeast* 15, 1159-1169.
- Mey, A. R., Wyckoff, E. E., Kanukurthy, V., Fisher, C. R. a Payne, S. M. (2005). Iron and fur regulation in *Vibrio cholerae* and the role of fur in virulence. *Infect Immun* 73, 8167-8178.
- Mills, E., Pultz, I. S., Kulasekara, H. D. a Miller, S. I. (2011). The bacterial second messenger c-di-GMP: mechanisms of signalling. *Cell Microbiol* 13, 1122-1129.
- Minarikova, L., Kuthan, M., Ricicova, M., Forstova, J. a Palkova, Z. (2001). Differentiated gene expression in cells within yeast colonies. *Exp Cell Res* 271, 296-304.

- Moorthy, S. a Watnick, P. I. (2004). Genetic evidence that the *Vibrio cholerae* monolayer is a distinct stage in biofilm development. *Mol Microbiol* 52, 573-587.
- Moyed, H. S. a Broderick, S. H. (1986). Molecular cloning and expression of *hipA*, a gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J Bacteriol* 166, 399-403.
- Ngo Thi, N. A. a Naumann, D. (2007). Investigating the heterogeneity of cell growth in microbial colonies by FTIR microspectroscopy. *Anal Bioanal Chem* 387, 1769-1777.
- O'Brien, K. M., Dirmeier, R., Engle, M. a Poyton, R. O. (2004). Mitochondrial protein oxidation in yeast mutants lacking manganese-(MnSOD) or copper- and zinc-containing superoxide dismutase (CuZnSOD): evidence that MnSOD and CuZnSOD have both unique and overlapping functions in protecting mitochondrial proteins from oxidative damage. *J Biol Chem* 279, 51817-51827.
- O'Toole, G. A., Gibbs, K. A., Hager, P. W., Phibbs, P. V., Jr. a Kolter, R. (2000). The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182, 425-431.
- Ohkuni, K., Hayashi, M. a Yamashita, I. (1998). Bicarbonate-mediated social communication stimulates meiosis and sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 623-631.
- Okabe, S., Itoh, T., Satoh, H. a Watanabe, Y. (1999). Analyses of spatial distributions of sulfate-reducing bacteria and their activity in aerobic wastewater biofilms. *Appl Environ Microbiol* 65, 5107-5116.
- Palecek, S. P., Parikh, A. S. a Kron, S. J. (2000). Genetic analysis reveals that *FLO11* upregulation and cell polarization independently regulate invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 156, 1005-1023.
- Palková, Z., Devaux, F., Řiřicová, M., Mináriková, L., Le Crom, S. a Jacq, C. (2002). Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Mol Biol Cell* 13, 3901-3914.
- Palkova, Z. a Forstova, J. (2000). Yeast colonies synchronise their growth and development. *J Cell Sci* 113 (Pt 11), 1923-1928.
- Palková, Z., Janderová, B., Gabriel, J., Zikánová, B., Pospíšek, M. a Forstová, J. (1997). Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* 390, 532-536.

- Pan, X. a Heitman, J. (2000). Sok2 regulates yeast pseudohyphal differentiation via a transcription factor cascade that regulates cell-cell adhesion. *Mol Cell Biol* 20, 8364-8372.
- Parsek, M. R. a Tolker-Nielsen, T. (2008). Pattern formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Curr Opin Microbiol* 11, 560-566.
- Patel, C. N., Wortham, B. W., Lines, J. L., Fetherston, J. D., Perry, R. D. a Oliveira, M. A. (2006). Polyamines are essential for the formation of plague biofilm. *J Bacteriol* 188, 2355-2363.
- Patrauchan, M. A., Sarkisova, S. A. a Franklin, M. J. (2007). Strain-specific proteome responses of *Pseudomonas aeruginosa* to biofilm-associated growth and to calcium. *Microbiology* 153, 3838-3851.
- Piccirillo, S., White, M. G., Murphy, J. C., Law, D. J. a Honigberg, S. M. (2010). The Rim101p/PacC pathway and alkaline pH regulate pattern formation in yeast colonies. *Genetics* 184, 707-716.
- Purevdorj, B., Costerton, J. W. a Stoodley, P. (2002). Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 68, 4457-4464.
- Purnapatre, K. a Honigberg, S. M. (2002). Meiotic differentiation during colony maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 42, 1-8.
- Ramage, G., Bachmann, S., Patterson, T. F., Wickes, B. L. a Lopez-Ribot, J. L. (2002a). Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 49, 973-980.
- Ramage, G., Saville, S. P., Wickes, B. L. a Lopez-Ribot, J. L. (2002b). Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl Environ Microbiol* 68, 5459-5463.
- Ramsing, N. B., Kuhl, M. a Jorgensen, B. B. (1993). Distribution of sulfate-reducing bacteria, O₂, and H₂S in photosynthetic biofilms determined by oligonucleotide probes and microelectrodes. *Appl Environ Microbiol* 59, 3840-3849.
- Rani, S. A., Pitts, B., Beyenal, H., Veluchamy, R. A., Lewandowski, Z., Davison, W. M., Buckingham-Meyer, K. a Stewart, P. S. (2007). Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. *J Bacteriol* 189, 4223-4233.
- Raser, J. M. a O'Shea, E. K. (2004). Control of stochasticity in eukaryotic gene expression. *Science* 304, 1811-1814.

- Regev-Yochay, G., Trzcinski, K., Thompson, C. M., Lipsitch, M. a Malley, R. (2007). SpxB is a suicide gene of *Streptococcus pneumoniae* and confers a selective advantage in an in vivo competitive colonization model. *J Bacteriol* 189, 6532-6539.
- Resch, A., Rosenstein, R., Nerz, C. a Gotz, F. (2005). Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Appl Environ Microbiol* 71, 2663-2676.
- Reynolds, T. B. a Fink, G. R. (2001). Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* 291, 878-881.
- Reynolds, T. B., Jansen, A., Peng, X. a Fink, G. R. (2008). Mat formation in *Saccharomyces cerevisiae* requires nutrient and pH gradients. *Eukaryot Cell* 7, 122-130.
- Richard, M. L., Nobile, C. J., Bruno, V. M. a Mitchell, A. P. (2005). *Candida albicans* biofilm-defective mutants. *Eukaryot Cell* 4, 1493-1502.
- Rintala, E., Toivari, M., Pitkanen, J. P., Wiebe, M. G., Ruohonen, L. a Penttila, M. (2009). Low oxygen levels as a trigger for enhancement of respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics* 10, 461.
- Rosenfeld, E., Schaeffer, J., Beauvoit, B. a Salmon, J. M. (2004). Isolation and properties of promitochondria from anaerobic stationary-phase yeast cells. *Antonie Van Leeuwenhoek* 85, 9-21.
- Sakuragi, Y. a Kolter, R. (2007). Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (pel) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189, 5383-5386.
- Salhi, B. a Mendelson, N. H. (1993). Patterns of gene expression in *Bacillus subtilis* colonies. *J Bacteriol* 175, 5000-5008.
- Sato, T., Watanabe, T., Mikami, T. a Matsumoto, T. (2004). Farnesol, a morphogenetic autoregulatory substance in the dimorphic fungus *Candida albicans*, inhibits hyphae growth through suppression of a mitogen-activated protein kinase cascade. *Biol Pharm Bull* 27, 751-752.
- Sauer, K., Cullen, M. C., Rickard, A. H., Zeef, L. A., Davies, D. G. a Gilbert, P. (2004). Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J Bacteriol* 186, 7312-7326.
- Saville, R. M., Rakshe, S., Haagensen, J. A., Shukla, S. a Spormann, A. M. (2011). Energy-dependent stability of *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. *J Bacteriol* 193, 3257-3264.
- Sehati, S., Clement, M. H., Martins, J., Xu, L., Longo, V. D., Valentine, J. S. a Gralla, E. B. (2011). Metabolic alterations in yeast lacking copper-zinc superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med* 50, 1591-1598.

- Shapiro, J. A. (1984). The use of Mudlac transposons as tools for vital staining to visualize clonal and non-clonal patterns of organization in bacterial growth on agar surfaces. *J Gen Microbiol* 130, 1169-1181.
- Shapiro, J. A. (1992). Differential action and differential expression of DNA polymerase I during *Escherichia coli* colony development. *J Bacteriol* 174, 7262-7272.
- Sharma, M. a Prasad, R. (2011). The quorum-sensing molecule farnesol is a modulator of drug efflux mediated by ABC multidrug transporters and synergizes with drugs in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 4834-4843.
- Shemesh, M., Tam, A. a Steinberg, D. (2007). Expression of biofilm-associated genes of *Streptococcus mutans* in response to glucose and sucrose. *J Med Microbiol* 56, 1528-1535.
- Shenhar, G. a Kassir, Y. (2001). A positive regulator of mitosis, Sok2, functions as a negative regulator of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21, 1603-1612.
- Schembri, M. A., Kjaergaard, K. a Klemm, P. (2003). Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* 48, 253-267.
- Scherz, R., Shinder, V. a Engelberg, D. (2001). Anatomical analysis of *Saccharomyces cerevisiae* stalk-like structures reveals spatial organization and cell specialization. *J Bacteriol* 183, 5402-5413.
- Schmelzle, T., Beck, T., Martin, D. E. a Hall, M. N. (2004). Activation of the RAS/cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast. *Mol Cell Biol* 24, 338-351.
- Schramm, A., Larsen, L. H., Revsbech, N. P., Ramsing, N. B., Amann, R. a Schleifer, K. H. (1996). Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl Environ Microbiol* 62, 4641-4647.
- Sitnikov, D. M., Schineller, J. B. a Baldwin, T. O. (1995). Transcriptional regulation of bioluminescence genes from *Vibrio fischeri*. *Mol Microbiol* 17, 801-812.
- Smets, B., Ghillebert, R., De Snijder, P., Binda, M., Swinnen, E., De Virgilio, C. a Winderickx, J. (2010). Life in the midst of scarcity: adaptations to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 56, 1-32.
- Smith, K. D., Lipchock, S. V., Livingston, A. L., Shanahan, C. A. a Strobel, S. A. (2010). Structural and biochemical determinants of ligand binding by the c-di-GMP riboswitch. *Biochemistry* 49, 7351-7359.

- Soulard, A., Cremonesi, A., Moes, S., Schutz, F., Jenö, P. & Hall, M. N. (2010). The rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that TOR controls protein kinase A toward some but not all substrates. *Mol Biol Cell* 21, 3475-3486.
- Spoering, A. L. & Lewis, K. (2001). Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol* 183, 6746-6751.
- Stanley, N. R., Britton, R. A., Grossman, A. D. & Lazazzera, B. A. (2003). Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays. *J Bacteriol* 185, 1951-1957.
- Stewart, P. S. (2003). Diffusion in biofilms. *J Bacteriol* 185, 1485-1491.
- Stewart, P. S. & Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 6, 199-210.
- Strain, J., Lorenz, C. R., Bode, J., Garland, S., Smolen, G. A., Ta, D. T., Vickery, L. E. & Culotta, V. C. (1998). Suppressors of superoxide dismutase (SOD1) deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of proteins predicted to mediate iron-sulfur cluster assembly. *J Biol Chem* 273, 31138-31144.
- Strovas, T. J. & Lidstrom, M. E. (2009). Population heterogeneity in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Microbiology* 155, 2040-2048.
- Sumner, E. R., Avery, A. M., Houghton, J. E., Robins, R. A. & Avery, S. V. (2003). Cell cycle- and age-dependent activation of Sod1p drives the formation of stress resistant cell subpopulations within clonal yeast cultures. *Mol Microbiol* 50, 857-870.
- Swain, P. S., Elowitz, M. B. & Siggia, E. D. (2002). Intrinsic and extrinsic contributions to stochasticity in gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12795-12800.
- Taniguchi, Y., Choi, P. J., Li, G. W., Chen, H., Babu, M., Hearn, J., Emili, A. & Xie, X. S. (2010). Quantifying *E. coli* proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells. *Science* 329, 533-538.
- Thormann, K. M., Saville, R. M., Shukla, S. & Spormann, A. M. (2005). Induction of rapid detachment in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. *J Bacteriol* 187, 1014-1021.
- Vachova, L., Devaux, F., Kucerova, H., Ricicova, M., Jacq, C. & Palkova, Z. (2004). Sok2p transcription factor is involved in adaptive program relevant for long term survival of *Saccharomyces cerevisiae* colonies. *J Biol Chem* 279, 37973-37981.
- Vachova, L., Kucerova, H., Devaux, F., Ulehlova, M. & Palkova, Z. (2009). Metabolic diversification of cells during the development of yeast colonies. *Environ Microbiol* 11, 494-504.

- Vachova, L. a Palkova, Z. (2005). Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. *J Cell Biol* 169, 711-717.
- Váchová, L., Šťoviček, V., Hlaváček, O., Chernyavskiy, O., Štěpánek, L., Kubinová, L. a Palková, Z. (2011). Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies. *J Cell Biol* 194, 679-687.
- Valenzuela, L., Aranda, C. a Gonzalez, A. (2001). TOR modulates *GCN4*-dependent expression of genes turned on by nitrogen limitation. *J Bacteriol* 183, 2331-2334.
- Veening, J. W., Igoshin, O. A., Eijlander, R. T., Nijland, R., Hamoen, L. W. a Kuipers, O. P. (2008). Transient heterogeneity in extracellular protease production by *Bacillus subtilis*. *Mol Syst Biol* 4, 184.
- Vlamakis, H., Aguilar, C., Losick, R. a Kolter, R. (2008). Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes Dev* 22, 945-953.
- Ward, M. P., Gimeno, C. J., Fink, G. R. a Garrett, S. (1995). *SOK2* may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription. *Mol Cell Biol* 15, 6854-6863.
- Webb, J. S., Thompson, L. S., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Givskov, M. a Kjelleberg, S. (2003). Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* 185, 4585-4592.
- Wilson, G. S. (1922). The proportion of viable bacteria in young cultures with especial reference to the technique employed in counting. *J Bacteriol* 7, 405-446.
- Xu, K. D., Stewart, P. S., Xia, F., Huang, C. T. a McFeters, G. A. (1998). Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Appl Environ Microbiol* 64, 4035-4039.
- Yang, Z., Geng, J., Yen, W. L., Wang, K. a Klionsky, D. J. (2010). Positive or negative roles of different cyclin-dependent kinase Pho85-cyclin complexes orchestrate induction of autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 38, 250-264.
- Yarwood, J. M., Bartels, D. J., Volper, E. M. a Greenberg, E. P. (2004). Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* 186, 1838-1850.
- Yeater, K. M., Chandra, J., Cheng, G., Mukherjee, P. K., Zhao, X., Rodriguez-Zas, S. L., Kwast, K. E., Ghannoum, M. A. a Hoyer, L. L. (2007). Temporal analysis of *Candida albicans* gene expression during biofilm development. *Microbiology* 153, 2373-2385.
- Yildiz, F. H., Liu, X. S., Heydorn, A. a Schoolnik, G. K. (2004). Molecular analysis of rugosity in a *Vibrio cholerae* O1 El Tor phase variant. *Mol Microbiol* 53, 497-515.

- Zara, S., Gross, M. K., Zara, G., Budroni, M. a Bakalinsky, A. T. (2010). Ethanol-independent biofilm formation by a flor wine yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 76, 4089-4091.
- Zhu, J. a Mekalanos, J. J. (2003). Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*. *Dev Cell* 5, 647-656.
- Zikanova, B., Kuthan, M., Ricicova, M., Forstova, J. a Palkova, Z. (2002). Amino acids control ammonia pulses in yeast colonies. *Biochem Biophys Res Commun* 294, 962-967.
- Zurita-Martinez, S. A. a Cardenas, M. E. (2005). Tor and cyclic AMP-protein kinase A: two parallel pathways regulating expression of genes required for cell growth. *Eukaryot Cell* 4, 63-71.